

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

11.580



* 5 3 0 9 5 6 2 2 2 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Utilización de las Aspergilinas
en la generación de inmunotoxinas dirigidas
contra carcinomas humanos

Tesis que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas
presenta D. Saturnino Muñoz Martínez
Sección de Inmunquímica,
Departamento de Investigación, Hospital
Ramón y Cajal, Madrid, Diciembre de 1992.



HOSPITAL RAMON Y CAJAL
AREA SANITARIA 4
28034 MADRID



FRANCISCO P. CONDE MONTERO-RIOS, Doctor en Medicina, Jefe de la Sección de Inmunoquímica del Departamento de Investigación del Hospital "Ramon y Cajal" de Madrid

INFORMA:

Que D. SATURNINO MUÑOZ MARTINEZ, Licenciado en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo "Utilización de las aspergilinas en la generación de inmunotoxinas dirigidas contra carcinomas humanos" y considero que reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

Lo cual firmo, en Madrid a 4 de Diciembre de 1992.

Fdo. Dr. Francisco P. Conde Montero-Rios

El doctorando:

Fdo. Saturnino Muñoz Martínez

A *Saturnino* y a *Juliana*, mis padres

A *Ana*

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios de la Sección de Inmunoquímica, del Departamento de Investigación del Hospital "Ramon y Cajal" del INSALUD en Madrid.

Deseo expresar mi mas sincera gratitud al Dr. Francisco P. Conde Montero-Rios, Doctor en Medicina y Jefe de dicha Sección, no sólo por la dirección, supervisión y crítica en este trabajo, sino tambien por el interés que en todo momento ha demostrado por mi formación profesional y humana y por el desarrollo de mi carrera científica, así como por su amistad y su apoyo a lo largo de todos estos años. Muchas gracias.

Mi agradecimiento y recuerdo a todos aquellos que en estos años han trabajado y trabajan en la Sección de Inmunoquímica, y en particular a Stephanie Salvarelli Martín, por su apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo y por su comprensión y amistad a lo largo de estos tres últimos años. Gracias.

Agradezco a la Dra. Maria Innes' Colnaghi, Directora del *Riparto di Oncologia Sperimentale E*, del *Istituto Nazionale dei Tumori* de Milán, Italia, por la entrañable acogida que me ha dispensado en su Departamento y por su colaboración y el apoyo demostrado. Así mismo, agradezco a la Dra. Silvana Canevari, de dicho Departamento el que me haya permitido realizar parte del trabajo experimental de esta tesis con su grupo en Milán, así como por su consejo y dirección en los meses que he estado entre ellos y por su cordialidad en las distintas ocasiones en que hemos tenido ocasión de encontrarnos.

Deseo expresar mi agradecimiento a todos los miembros del *Riparto di Oncologia Sperimentale*, por su apoyo, amistad y comprensión.

Así mismo, agradezco al Dr. Carlos Fernandez Ardavin, Profesor Adjunto del Departamento de Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, por su tutoría durante el desarrollo de mis estudios de Doctorado y por encargarse de la ponencia de este Tesis.

Agradezco a la *European Association for Cancer Research* y a la *Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro* por la concesión de la bolsa de viaje que me permitió realizar mi trabajo y ampliar mi formación en Milán, así como a la *Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cancer* por la concesión de una Beca que me ha permitido terminar esta tesis y continuar con la labor iniciada en el campo de la Investigación Cancerológica.

Durante gran parte del período de realización de esta tesis, he sido beneficiario de una Beca del *Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social*, dentro de su programa de Formación del Personal Investigador, lo cual agradezco públicamente.

El apoyo de Ana Molina Ocaña, trasciende su asistencia en la redacción de esta tesis, por la que aquí figura.

Abreviaturas

Å:	Amstrom, unidad de longitud equivalente a 10^{-10} metros
AcH/AcNa:	Tampon ácido acetico/acetato sódico
AcMo(s):	Anticuerpo(s) monoclonal(es)
AcMo-PDP o AcMo-MPT:	Anticuerpo monoclonal tras la reacción con SPDP o SMPT, respectivamente
ADN:	Acido desoxirribonucleico
ADP:	Adenosil difosfato
AMPC:	Adenosin monofosfato ciclico
ARNr:	Acido ribonucleico ribosómico
ARNm:	Acido ribonucleico mensajero
ARNt:	Acido ribonucleico transferente
Aspg-I:	Antígeno o alergeno aislado de <i>Aspergillus fumigatus</i>
aspergilina-PDP:	Molécula de aspergilina tras la reaccion con SPDP
aspergilina-SH:	Molécula de aspergilina-PDP, tras la reducción de los grupos PDP con ditioneitol
ATCC:	"American Type Culture Collection"
ATP:	Adenosin trifosfato
α -7S:	Inmunoglobulina G de cabra contra el fragmento Fc de la inmunoglobulina G de ratón
BSA:	Albúmina de suero bovina
Ci:	Curio, unidad de radiactividad que corresponde a 2.22×10^{12} Bequerelios por minuto
CM:	Carboximetil
cpm o CPM:	Cuentas por minuto
DEAE:	Dietilaminoetil
DMF:	N,N-Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfoxido
D.O.:	Densidad óptica
DT:	Toxina diftérica, aislada de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
DTT:	Ditioneitol
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacetico
EGFr:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermico
EGTA:	Etilen glicol-bis(B-aminoethyl eter)
FE 1 o Ia y FE 2 o G:	Factores implicados en la fase de elongacion de la síntesis de proteínas
Fc:	Fragmento cristizable de la inmunoglobulina
g:	Aceleracion de la gravedad, 9.8 m/s^2
Gal:	Galactosa
GTP:	Guanidin trifosfato
HEPES	Acido N-(2-hidroxietil) piperacina-N'-(2-etanosulfónico)
HCl:	Inhibidor de la síntesis de proteínas aislado del latex de <i>Hura crepitans</i>
HPLC:	Cromatografia liquida de alta resolucion
HPLC-HCA:	Cromatografia liquida de alta resolucion en una matriz de hidroxilapatita

IC ₅₀ :	Concentración requerida para inhibir el 50% de la síntesis de proteína o para reducir el número de células a la mitad
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
IODOGEN:	1,3,4,6,-tetracloruro-3a,6a difenilglicoluril
I.T.:	Índice terapéutico o cociente entre el valor IC ₅₀ de la toxina y el valor IC ₅₀ obtenido para la inmunotoxina sobre la célula diana
KLH:	Hemocianina del molusco <i>Megathura crenulata</i> . "Keyhole limpet haemocyanin"
L3, L4 y L14:	Proteínas de la subunidad mayor de los ribosomas de eucariotas
LD ₅₀ :	Dosis letal 50, concentración de proteína que mata a la mitad de los animales inoculados
M:	molaridad
mA:	miliamperio
MAP:	Proteína antiviral de <i>Mirabilis jalapa</i>
MDH:	Departamento de Salud del Estado de Michigan, "Medical Department of Health USA"
MPT:	Metil- α -(2-piridilditio)-tolueno
m S/cm:	milisiemen por centímetro, unidad de conductividad
nm:	nanometro
mw o Mw:	Peso molecular
PAGE-SDS:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
PAP:	Proteína antiviral de <i>Phytolacca americana</i>
PBS:	Tampón fosfato salino
PBS-az:	Tampón fosfato salino con 0.1% p/v de azida sódica
PCL:	Lectina aislada de <i>Phoradendron californicum</i>
PE:	Exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pI:	Punto isoeléctrico
p/v:	Peso/volumen
r ² :	Coefficiente de regresión
RCA:	Cadena A de la ricina, aislada de <i>Ricinus communis</i>
RIA:	Radioinmunoensayo
RIPs:	Proteínas inactivadores de ribosomas
RNasa:	Ribonucleasa
RPMI:	Medio de cultivo del "Roswell Park Memorial Institute"
S:	Svedberg, unidad de velocidad de sedimentación
SDS:	Dodecil sulfato sódico
STF:	Suero de ternera fetal
PDP:	Piridil ditio propionato
SPDP:	N-succinimidil 3-(2-piridil ditio) propionato
SMPT:	4-succinimidil oxycarbonil- α -metil- α (2-piridil ditio) butirato
TAIS:	Tubos de agar inclinado
TCA:	Ácido tricloroacético
TEMED:	N-N'-N''-N'''-tetrametilendiamina
Tris:	Tris(hidroximetil) aminoetano
v:	Voltio
v/v:	Volumen/volumen

0. INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Presentación del trabajo	2
1.2. Inmunotoxinas: concepto y estructura	5
1.3. Toxinas utilizadas en la generación de las inmunotoxinas	6
1.3.1. Toxinas de origen vegetal	6
1.3.1.1. Definición	6
1.3.1.2. Tipos de toxinas protéicas de origen vegetal...	8
1.3.1.3. Estructura	9
1.3.1.3.1. Estructura primaria	9
1.3.1.3.2. Estructura secundaria y terciaria	15
1.3.1.3.3. Genes que codifican para las toxinas vegetales	17
1.3.1.4. Actividad	18
1.3.1.4.1. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistemas libres de células	18
1.3.1.4.2. Actividad en células	19
1.3.1.4.4. Actividad <i>in vivo</i>	22
1.3.1.4.3. Otras actividades.....	23
1.3.2. Toxinas de origen bacteriano	24
1.3.2.1. Definición	24
1.3.2.2. Estructura y actividad	24
1.3.2.3. Actividad en células	26
1.3.3. Entrada en células de las toxinas vegetales y bacterianas	26
1.3.4. Estudio de la actividad citotóxica de las toxinas vegetales y bacterianas	27
1.3.5. Toxinas de origen fúngico: aspergilinas	28
1.3.5.1. El género <i>Aspergillus</i>	28
1.3.5.1.1. Introducción histórica	28
1.3.5.1.2. Clasificación del género <i>Aspergillus</i>	29
1.3.5.1.3. Descripción y morfología	30
1.3.5.1.4. Condiciones de cultivo, distribución y aplicaciones de las especies de <i>Aspergillus</i>	32
1.3.5.1.5. <i>Aspergillus restrictus</i>	35
1.3.5.1.6. <i>Aspergillus giganteus</i>	35
1.3.5.2. Definición de las aspergilinas	37
1.3.5.3. Aislamiento y purificación	38
1.3.5.4. Estructura	38
1.3.5.4.1. Estructura primaria	38
1.3.5.4.2. Estructura secundaria y terciaria	39
1.3.5.4.3. Genes que codifican para las aspergilinas ...	41
1.3.5.5. Actividad	43
1.3.5.5.1. Inhibición de síntesis de proteínas	43
1.3.5.5.2. Otras actividades ribonucleásicas	46
1.3.5.5.3. Importancia del dominio α -sarcina/ricina del ARNr	47
1.3.5.5.4. Modificación inducidas en los ribosomas eucarióticos por la α -sarcina. Comparación con la ricina	47
1.3.5.5.5. Actividad antitumoral y entrada en	

células	51
1.3.5.6. Aplicaciones y perspectivas	52
1.3.5.7. Comparación de las aspergilinas con otras enzimas de actividad ribonucleasa	55
1.4. Anticuerpos monoclonales utilizados en cancerología ...	56
1.4.1. Obtención de anticuerpos monoclonales contra tumores	56
1.4.2. Anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a tumores	56
1.4.3. Características de los anticuerpos monoclonales ...	58
1.4.3.1. Características relacionadas con el tumor ...	58
1.4.3.2. Características relacionadas con el anticuerpo	59
1.4.4. Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales contra tumores	60
1.5. Reactivos de unión	62
1.5.1. Definición	62
1.5.1.1. Agentes bifuncionales que introducen puentes disulfuro (S-S)	62
1.5.1.2. Agentes bifuncionales que introducen enlaces tioéter (C-S)	63
1.5.2. Problemas derivados de la utilización de ambos tipos de enlaces	67
1.6. Inmunotoxinas	68
1.6.1. Introducción	68
1.6.2. Tipos de inmunotoxinas	70
1.6.3. Purificación de las inmunotoxinas	72
1.6.4. Actividad de las inmunotoxinas	74
1.6.4.1. Métodos de valoración de la actividad ...	74
1.6.4.2. Modo de acción de las inmunotoxinas	76
1.6.4.3. Potenciamiento de la actividad	77
1.6.5. Cinética <i>in vivo</i>	79
1.6.6. Aplicaciones	80
1.6.6.1. Tratamiento de distintos tipos de tumores	80
1.6.6.1.1. Problemas derivados de la aplicación clínica de las inmunotoxinas	82
1.6.6.1.2. Nuevas estrategias empleadas	87
1.6.6.2. Otras aplicaciones	87
2. MATERIALES Y METODOS	89
2.1. Material biológico	90
2.1.1. Toxinas	90
2.1.1.1. Aspergilinas	90
2.1.1.2. Toxinas vegetales	90
2.1.2. Líneas celulares	90
2.1.3. Antiseros	96
2.1.3.1. Antiseros policlonales	96
2.1.3.2. Anticuerpos monoclonales	96

2.2. Cultivo de <i>Aspergillus</i>	100
2.2.1. Cultivo de <i>Aspergillus</i> en medios sólidos	100
2.2.1.1. Medios de cultivo	100
2.2.1.2. Preparación de los medios de cultivo	100
2.2.1.3. Siembra de los medios de cultivo	101
2.2.2. Cultivo de <i>Aspergillus</i> en medio líquido	102
2.2.2.1. Preparación de los medios de cultivo	102
2.2.2.2. Siembra de los medios de cultivo	102
2.2.3. Inactivación del micelio de <i>Aspergillus</i>	103
2.2.4. Conservación de las cepas de <i>Aspergillus</i>	103
2.2.4.1. Mantenimiento de las cepas	103
2.2.4.2. Conservación en tierra	103
2.2.5. Cultivo de <i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894	104
2.2.6. Variación de la composición de los medios y de las condiciones de cultivo de <i>A. giganteus</i> MDH 18894 ...	104
2.2.6.1. Composición de los nuevos medios de cultivo líquido	104
2.2.6.2. Preparación de los nuevos medios de cultivo líquido	106
2.2.7. Aislamiento de las distintas estructuras de <i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894,	107
2.2.7.1. Obtención de una fracción enriquecida en hifas ...	107
2.2.7.2. Obtención de una fracción enriquecida en conidióforos libres de esporas	107
2.2.7.3. Obtención de una fracción enriquecida en esporas	107
2.3. Técnicas de determinación de proteínas	108
2.3.1. Cálculo de la concentración de proteínas presentes en las distintas soluciones	108
2.3.1.1. Determinación de la absorbancia de las soluciones a 280 nm	108
2.3.1.2. Otras técnicas	108
2.3.2. Concentración de soluciones de proteína por ultrafiltración	109
2.3.3. Diálisis de soluciones de proteína	109
2.3.4. Precipitación con sulfato amónico	111
2.3.5. Liofilización de las soluciones de proteína	111
2.3.6. Determinación de la concentración de hexosas	111
2.3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS) ...	113
2.3.7.1. Preparación y desarrollo de los geles en sistema vertical	113
2.3.7.2. Secado de los geles de poliacrilamida	114
2.3.7.3. Geles de Poliacrilamida en el sistema automá- tico "Phastsystem"	114
2.4. Técnicas cromatográficas	114
2.4.1. Activación de las resinas de intercambio iónico ...	114
2.4.2. Activación de la resina Sepharose CL-4B con ácido clorhídrico	115
2.4.3. Unión de los colorantes triazínicos a Sepharose CL-4B	115

2.4.3.1.	Reacción entre los colorantes triazínicos y la Sepharose CL-4B	115
2.4.3.2.	Cálculo de la cantidad de colorante ligado por mililitro de resina	117
2.4.4.	Interacción de las toxinas con colorantes triazínicos inmovilizados	118
2.4.4.1.	Cromatografía de afinidad de α -sarcina en Blue-Sepharosa y el Red-Sepharosa en distintas condiciones experimentales	118
2.4.4.2.	Cromatografía de afinidad en Affi-Gel Blue ...	119
2.4.5.	Unión de la α -sarcina a una matriz de Sepharose CL-4B activada con bromuro de cianógeno	120
2.5.	Técnicas inmunoquímicas	120
2.5.1.	Preparación de antisueros policlonales y de anticuerpos monoclonales	120
2.5.1.1.	Obtención de un antisuero policlonal contra mitogilina	120
2.5.1.2.	Obtención de un antisuero policlonal contra la α -sarcina	120
2.5.1.3.	Obtención de un antisuero policlonal contra la ricina	121
2.5.1.4.	Obtención del líquido ascítico de la cavidad intraperitoneal de ratones nu/nu Balb/c	121
2.5.2.	Purificación de inmunoglobulinas.....	122
2.5.2.1.	Purificación de IgG total a partir de suero de conejo	122
2.5.2.2.	Purificación de IgG específica contra la α -sarcina a partir de suero de conejo	124
2.5.2.3.	Purificación de los anticuerpos monoclonales a partir del líquido ascítico	124
2.5.3.	Estudios de la inmunogenicidad de las toxinas en ratones Balb/c	126
2.5.3.1.	Determinación de la inmunogenicidad de las toxinas en ratones Balb/c	126
2.5.3.2.	Protocolos de inmunización de los ratones Balb/c con α -sarcina	127
2.5.4.	Técnicas de inmunoprecipitación en geles de agarosa ...	127
2.5.4.1.	Inmunodifusión doble en dos dimensiones	128
2.5.4.2.	Inmunodifusión radial simple	128
2.5.4.3.	Obtención de una recta patrón por Mancini	129
2.5.5.	Técnicas de inmunoelectroforesis	129
2.5.5.1.	Inmunoelectroforesis en geles de agarosa	129
2.5.5.2.	Inmunoelectroforesis en una dimensión o "Rocket"	129
2.5.5.3.	Inmunoelectroforesis cruzada en dos dimensiones o "Crossed"	131
2.6.	Purificación de las toxinas	132
2.6.1.	Purificación de la α -sarcina	132
2.6.1.1.	Procesamiento del medio de cultivo	132
2.6.1.2.	Cromatografía en DE 23 cellulose	132
2.6.1.3.	Cromatografía en CM 23 cellulose	132
2.6.1.4.	Filtración en Sephadex G-10	133
2.6.2.	Purificación de la ricina	134
2.6.2.1.	Obtención del extracto libre de células de	

semilla de <i>Ricinus communis</i> L.	134
2.6.2.2. Cromatografía en Sepharose CL-4B activada con HCl	134
2.6.2.3. Cromatografía en Sephadex G-100	135
2.6.2.4. Reducción de la ricina total	135
2.6.3. Purificación de la briodina	135
2.6.3.1. Obtención del extracto de raíces de <i>Bryonia dioica</i> Jacq.	135
2.6.3.2. Cromatografía en CM-Sepharose Fast Flow	136
2.7. Preparación de las inmunotoxinas	136
2.7.1. Reacción de las aspergilinas con SPDP	136
2.7.2. Reducción de los grupos PDP incorporados a las aspergilinas	136
2.7.3. Reacción de los anticuerpos monoclonales con agentes bifuncionales	137
2.7.3.1. Reacción de los anticuerpos monoclonales con SPDP	137
2.7.3.2. Reacción del anticuerpo monoclonal MINT-5 con SMPT	137
2.7.3.3. Reducción de los grupos MPT incorporados a MINT-5	138
2.7.4. Evaluación del número de grupos PDP y MPT incorporados a los anticuerpos monoclonales	138
2.7.5. Reacciones de conjugación	138
2.7.5.1. Reacción de conjugación entre AcMo-PDP y aspergilina-PDP. Purificación de las inmunotoxinas	138
2.7.5.2. Reacción de conjugación entre MINT-5-MPT con α -sarcina-PDP. Purificación de las inmunotoxinas	140
2.7.5.3. Reacción de conjugación de MBr 1 con la cadena A de la ricina. Purificación de las inmunotoxinas	140
2.7.6. Determinación del número de moléculas de toxina incorporadas por molécula de anticuerpo monoclonal ...	140
2.8. Técnicas de radiactividad	142
2.8.1. Marcaje radiactivo de proteínas	142
2.8.1.1. Marcaje de las toxinas con ^{125}I por el método del Iodogen	142
2.8.1.2. Marcaje de los anticuerpos policlonales y monoclonales con ^{125}I	144
2.8.1.2.1. Marcaje por el método de la cloramina T ...	144
2.8.1.2.2. Marcaje por el método de la lactoperoxidasa	144
2.8.2. Técnicas de radioinmunoensayo	145
2.8.2.1. Determinación de la concentración de α -sarcina ...	145
2.8.2.1.1. Obtención de la recta patrón de inhibición de fijación de ^{125}I - α -sarcina con α -sarcina fría	145
2.8.2.1.2. Determinación de la concentración de α -sarcina en los medios de cultivo de <i>A. giganteus</i> MDH 18894	147

2.8.2.2.	Técnicas de radioinmunoensayos en fase sólida	147
2.8.2.2.1.	Radioinmunoensayo sobre células	147
2.8.2.2.2.	Radioinmunoensayo sobre proteínas	148
2.9.	Técnicas de cultivos celulares	149
2.9.1.	Cultivo de las líneas celulares	149
2.9.1.1.	Condiciones y medio de cultivo	149
2.9.1.2.	Mantenimiento de los cultivos celulares	149
2.9.2.	Tripsinización de las líneas celulares	150
2.9.3.	Siembra de las células en placas	150
2.9.4.	Fijación de las células a placas con glutaraldehído	150
2.9.5.	Técnicas de recuento del número de células	151
2.9.6.	Conservación de las líneas celulares	151
2.10.	Estudios de actividad <i>in vitro</i>	152
2.10.1.	Actividad en sistemas acelulares	152
2.10.1.1.	Inhibición de la síntesis de proteínas en sistemas libres de células	152
2.10.1.2.	Determinación de la actividad ribonucleasa de la α -sarcina sobre polímeros sintéticos	153
2.10.2.	Actividad en líneas celulares en cultivo	154
2.10.2.1.	Cuantificación de la internalización de los complejos anticuerpo monoclonal-antígeno	154
2.10.2.2.	Estudios de competición sobre fijación a células entre anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas	155
2.10.2.3.	Determinación de la citotoxicidad	156
2.10.2.3.1.	Inhibición de la síntesis de proteínas	156
2.10.2.3.2.	Inhibición de la proliferación celular	157
2.10.2.3.3.	Potenciación de la acción de las inmunotoxinas con ionóforos y agentes iónicos	158
2.11.	Estudios de actividad <i>in vivo</i>	158
2.11.1.	Estudios de toxicidad <i>in vivo</i> de las toxinas	158
2.11.2.	Determinación de la Dosis Letal 50 (LD ₅₀)	158
2.11.3.	Biodistribución de las toxinas	159
2.11.3.1.	Aclaramiento en plasma de la restrictocina y la ricina	159
2.11.3.2.	Determinación de los parámetros farmacológicos	160
2.11.3.3.	Distribución de ¹²⁵ I-restrictocina en los órganos de conejos New Zealand	161
2.11.4.	Neutralización del desarrollo de tumores en ratones nu/nu Balb/c	161
2.12.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de las aspergilinas con ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico	163

3. RESULTADOS Y DISCUSION	164
3.1. Cultivo de <i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894	165
3.1.1. Cultivo en medios sólidos y líquidos	165
3.1.1.1. Cultivo en medios sólidos	165
3.1.1.2. Cultivo en medio líquido	165
3.1.2. Variaciones en las condiciones de cultivo	169
3.1.2.1. Variaciones en el crecimiento	173
3.1.2.2. Variaciones de pH	173
3.1.2.3. Variaciones en la conductividad	180
3.1.2.4. Variaciones en la concentración de hexosas ...	187
3.1.2.5. Concentración de α -sarcina en los medios de cultivo	187
3.1.2.6. Elección del medio de cultivo líquido	188
3.1.3. Producción de α -sarcina por las distintas estructuras de <i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894 ...	190
3.2. Purificación de las toxinas	190
3.2.1. Purificación de la α -sarcina	190
3.2.1.1. Obtención del medio de cultivo libre de micelio de <i>A. giganteus</i> MDH 18894	192
3.2.1.2. Cromatografía en resinas de intercambio iónico ...	193
3.2.1.3. Filtración en Sephadex G-10	199
3.2.1.4. Análisis inmunoelectroforético de las fracciones eluidas de CM 23 cellulose	203
3.2.2. Purificación de la ricina	203
3.2.2.1. Cromatografía de afinidad en Sepharosa CL-4B activada con ácido clorhídrico	205
3.2.2.2. Filtración en Sephadex G-100	205
3.2.3. Purificación de la briodina	211
3.2.4. Análisis comparativo de las distintas toxinas	215
3.3. Actividad de las toxinas	215
3.3.1. Actividad de las toxinas en inhibición de síntesis de proteínas	215
3.3.1.1. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistemas libres de células	215
3.3.1.2. Modificación de la actividad de las aspergilinas tras su reacción con SPDP	217
3.3.2. Actividad citotóxica de las toxinas en distintas líneas celulares en cultivo	222
3.3.2.1. Características de las líneas celulares	223
3.3.2.2. Inhibición de síntesis de proteínas	223
3.3.2.2.1. Citotoxicidad de las aspergilinas	223
3.3.2.2.2. Citotoxicidad de las toxinas vegetales	226
3.3.2.3. Inhibición de la proliferación celular	228
3.3.2.4. Influencia del tiempo de exposición de las células a la toxina sobre los valores de citotoxicidad	230
3.3.2.5. Variación de la citotoxicidad de las aspergilinas tras la reacción con SPDP	230

3.4. Interacción de las toxinas con colorantes triazínicos inmovilizados	233
3.4.1. Interacción de la α -sarcina con colorantes triazínicos inmovilizados en distintas condiciones experimentales	235
3.4.2. Fraccionamiento en Affi-Gel Blue de distintas toxinas de una sola cadena	242
3.4.3. Estudio de la actividad de las fracciones obtenidas en Affi-Gel Blue	246
3.5. Estudio del comportamiento <i>in vivo</i> de las toxinas en modelos animales	246
3.5.1. Toxicidad en ratones Balb/c	246
3.5.2. Inmunogenicidad en ratones de las toxinas de cadena única	248
3.5.3. Biodistribución de las toxinas en conejos New Zealand	251
3.5.3.1. Aclaramiento de las toxinas en sangre	251
3.5.3.2. Distribución en tejidos de ^{125}I -restrictocina	256
3.6. Actividad ribonucleasa de la α -sarcina en polímeros sintéticos de ribonucleótidos	258
3.7. Comparación de las aspergilinas con distintas ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico	261
3.8. Anticuerpos monoclonales	261
3.8.1. Características de los anticuerpos monoclonales (AcMos)	261
3.8.2. Estudio de la unión de los anticuerpos monoclonales a sus células diana e internalización	264
3.8.3. Reacción de los anticuerpos monoclonales con los agentes bifuncionales de unión	270
3.9. Inmunotoxinas	272
3.9.1. Características de las inmunotoxinas sintetizadas con las aspergilinas	272
3.9.1.1. Purificación de las inmunotoxinas	272
3.9.1.2. Purificación del conjugado MINT-5- α -sarcina ...	276
3.9.1.3. Cálculo de las relaciones moleculares entre los componentes de la inmunotoxina	279
3.9.2. Estudios de unión a células de las distintas fracciones de conjugación	281
3.9.2.1. Determinación de la especificidad de unión con la superficie de las líneas celulares	281
3.9.2.2. Estudios de competición de unión a la superficie celular de las inmunotoxinas e intermediarios de MBr 1	285
3.9.3. Actividad de las inmunotoxinas	288
3.9.3.1. Actividad de inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de células	288
3.9.3.2. Actividad citotóxica de las inmunotoxinas	290
3.9.3.2.1. Actividad citotóxica de las inmunotoxinas sintetizadas con restrictocina	290
3.9.3.2.2. Efecto de la monensina y el cloruro amónico	

en la actividad de los conjugados MBr 1- restrictocina	294
3.9.3.2.3. Actividad citotóxica de las inmunotoxinas sintetizadas con α -sarcina	296
3.9.3.3. Actividad <i>in vivo</i> de MBr 1-restrictocina. Experimentos de neutralización del desarrollo de tumores en ratones nu/nu Balb/c	300
 4. DISCUSION GENERAL	304
4.1. Características de las aspergilinas	305
4.2. Elección de los anticuerpos monoclonales	309
4.3. Elección de los agentes de unión	310
4.4. Purificación de las inmunotoxinas	312
4.5. Actividad de las inmunotoxinas	313
4.6. Mejoramiento de las condiciones de obtención de α -sarcina	315
4.7. Comparación de las aspergilinas con otras ribonucleasas	316
 5. CONCLUSIONES	318
6. REFERENCIAS	324

The products aren't perfect, but they'll impact patients, either with improvements or cures. And they'll generate information to develop second and third generation immunoconjugates" Tanox Biosystem's Chang, tomado de B.J. Spalding, Bio/Technology (1991).

"Los productos no son perfectos, pero han impactado en los pacientes, con el mejoramientos o la cura de los mismos. Y estos han generado información para el desarrollo de una segunda y tercera generación de inmunoconjugados".

1. Introducción

1.1. Presentación del trabajo

El uso de agentes quimioterapéuticos ha resultado útil en la cura o en la reducción de muchos tipos de cánceres humanos. Sin embargo, es posible observar que algunas formas de tumores no responden inicialmente a la quimioterapia o, eventualmente, adquieren resistencia a este tipo de agentes químicos (1).

Ante estos resultados, se impuso la necesidad de desarrollar otros tipos de terapia que mostrasen una mayor efectividad. De esta manera, surgió la inmunoterapia, basada en la utilización de moléculas relacionadas con el sistema inmune y en la generación de anticuerpos contra las células tumorales (2).

La mayoría de las drogas utilizadas, se diseñan de forma que presenten toxicidad selectiva sobre células con capacidad proliferativa alta (3,4), de manera que muestran un efecto limitado en tumores que presentan un crecimiento lento y causan una marcada toxicidad en los tejidos compuestos por células de proliferación normal y alejados de la masa tumoral, como por ejemplo en células del tracto gastrointestinal o en la médula ósea (5,6). Esto hace necesaria la utilización de compuestos en los que la capacidad de división de las células no resulte decisiva para la actividad o eficacia del agente (7).

Las células tumorales expresan en su superficie un alto nivel de ciertos antígenos de diferenciación, receptores para factores de crecimiento o antígenos virales (8). En los años 60 se aseguraba que algunos de estos antígenos eran expresados únicamente en la membrana de las células tumorales por lo que fueron definidos como antígenos tumor específicos (2). Posteriormente ha sido posible observar que estas moléculas pueden aparecer expresadas en mucha menor densidad o solo en subpoblaciones minoritarias de células normales (8-10) y estos antígenos pasaron a denominarse tumor asociados (11).

La presencia de este tipo de moléculas y su distinta densidad en las células tumorales permite que estos antígenos se comporten como inmunógenos en animales, en donde inducen la síntesis de anticuerpos. Estos anticuerpos, reconocen principalmente las células tumorales, y en menor proporción los tejidos normales de los que estas han derivado (12-14).

La capacidad de los anticuerpos para lisis las células contra las que han sido sintetizados, fue una de las formas de inmunoterapia más utilizadas (14,15). Sin embargo, su actividad sobre tumores desarrollados en animales o en el hombre resulta muy limitada e, incluso la unión del anticuerpo a la superficie celular puede dar origen a fenómenos de realce en el crecimiento del tumor (15).

Hace más de 100 años, después de observar la específica interacción de antígeno y anticuerpo, Paul Ehrlich, concibe la idea de tratar el cancer con "balas mágicas" ("zauberkugeln" ó "magic bullet"). Estas moléculas estarían compuestas por toxinas unidas a anticuerpos capaces de reconocer las células tumorales

(16,17). Como resultado de dicha observación, a mediados de este siglo, se llevaron a cabo las primeras tentativas para hacer más potente la función efectora de los anticuerpos, con la unión de agentes de actividad antitumoral (18-20).

Los primeros pasos en este sentido fueron dados por Mathé y col en 1958 (18), utilizando A-metopterina y por Moolten y Cooperband en 1960 (19,20) con toxinas como la ricina y la toxina diftérica.

Para que estas moléculas pudieran resultar beneficiosas en el tratamiento de los tumores, eran necesarias dos cosas: en primer lugar, una alta especificidad de reconocimiento del tejido por parte de los anticuerpos, y en segundo lugar, que la función efectora de los agentes antitumorales permaneciera inactiva durante el transporte en el organismo y se activara sólo después de la unión del anticuerpo con las células diana (21). Así se desarrollaron toda una serie de moléculas que consistían en anticuerpos unidos químicamente a toxinas o subunidades tóxicas, y para las que se utilizó en 1980 por primera vez, el nombre de inmunotoxinas (22).

Antes de 1975, la obtención de anticuerpos que pudieran ser utilizados como transportadores de drogas o de toxinas, suponía un proceso complejo, ya que era necesario absorber el suero total con muestras de tejidos normales para eliminar los anticuerpos que reconocían estructuras comunes a células normales y células neoplásicas (21). Esto resultaba técnicamente difícil, ya que distintos procesamientos de los sueros mostraban distintas reactividades contra el tejido tumoral (21).

El desarrollo de la tecnología de hibridomas, hizo posible la producción de anticuerpos monoclonales (AcMos) que reconocen determinantes antigénicos individuales presentes en la superficie de las células y que muestran una elevada selectividad por el tejido tumoral, debido a que estos anticuerpos reaccionan sólo con un epítipo de superficie de los antígenos asociados a tumores, en los que se expresan de forma mayoritario (20) o a que se seleccionan como inmunógenos aquellos antígenos que se expresan de forma casi exclusiva en las células tumorales (23). Los anticuerpos monoclonales nunca llegan a presentar una reactividad del 100%, de manera que siempre es posible encontrar reactividad con los tejidos normales (24).

En los últimos 15 años, se han obtenido gran cantidad de AcMos cuya expresión es estable en ratón o en cultivos celulares. Muchos de estos anticuerpos han sido conjugados con drogas, radionucléidos y toxinas con el objeto de crear agentes terapéuticos selectivos o de poner a punto técnicas de diagnóstico y prevención de un gran número de enfermedades (7).

Entre los inmunoconjugados desarrollados para la terapia de enfermedades humanas, las inmunotoxinas suponen un gran desafío en el diseño de drogas y ofrecen ventajas con respecto a otras técnicas ensayadas:

- 1) Tras la unión de la toxina al AcMo, la proteína híbrida final obtenida combina la capacidad citotóxica de la toxina con la selectividad de unión del anticuerpo a la célula tumoral (7).

2) Las inmunotoxinas muestran mayor potencia, comparada con otros conjugados droga-ligando debido a que la toxina actúa de forma catalítica, reaccionando repetidamente con múltiples ligandos intracelulares, mientras que las drogas utilizadas como agentes quimioterapéuticos, reaccionan estequiométricamente (una sola vez y con un único ligando intracelular) (25).

Así, se calcula que son necesarias unas 20.000 alquilaciones de ADN para matar a una célula, cuando se utilizan drogas de bajo peso molecular, como el clorambucil (15), mientras que las toxinas vegetales, bacterinas y fúngicas son capaces de inactivar alrededor de 200 ribosomas o FE-2 (factores de elongación 2) por minuto y la entrada de una única molécula en el citosol puede matar a la célula (26,27).

3) Las toxinas muestran actividad tanto sobre células en división como sobre aquellas células que no se dividen (19). Este efecto no se observa en otro tipo de agentes, que actúan sobre los mecanismos de división celular, bien por alquilación del ADN, como el clorambucil (28), por inhibición del huso mitótico durante la división celular, como los alcalóides derivados de la vinca (4) o provocando mutaciones puntuales a nivel genético, como los isótopos radiactivos (28).

4) Por otro lado, mientras que las células cancerígenas son naturalmente resistentes o crean resistencia a distintas drogas, no se ha observado resistencia basada en la terapia llevada a cabo con toxinas. Las inmunotoxinas pueden actuar, sin embargo, sobre células resistentes a agentes quimioterápicos (1,29) o a hormonas (30).

5) Tanto los isótopos radiactivos como las toxinas, son capaces de actuar tras unirse a la superficie y entrar en las células, esto confiere a ambos agentes tóxicos, una excelente selectividad. Pero, por este motivo, las células a las que el conjugado no puede acceder bien porque no expresan en su superficie el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal o bien por razones de impedimento estérico, pueden escapar al efecto del fármaco (14).

Los conjugados con isótopos radiactivos resultan tóxicos también en las proximidades del tumor y originan un mayor grado de mortalidad general, pero el conjugado no localizado en el tumor causan efectos en otros tejidos que reciben dosis limitantes de radiactividad (21). Esto no ocurre con las inmunotoxinas, ya que estas sólo actúan en aquellas células en las que son capaces de internalizarse (31).

En este trabajo, se aborda la construcción de inmunotoxinas dirigidos contra líneas tumorales humanas, utilizando anticuerpos monoclonales con elevada selectividad y toxinas de naturaleza proteica aisladas del medio de cultivo de distintas especies de *Aspergillus*.

El interés que ha despertado en los últimos años este tipo de inmunoterapia, los alentadores resultados que se han obtenido en los distintos ensayos clínicos orientados al tratamiento de

distintas clases de tumores llevados a cabo con inmunotoxinas, así como el interés de la industria farmacéutica en este tipo de fármacos han llevado a nuestro grupo de trabajo a la producción de inmunoconjugados con distintos anticuerpos monoclonales sintetizados contra tumores de origen epitelial.

El trabajo experimental de esta tesis, ha sido realizado en la Sección de Inmunoquímica del Departamento de Investigación del Hospital "Ramón y Cajal" dentro de un Proyecto de Colaboración Internacional con la *Divisione di Oncologia Sperimentale E* del *Istituto Nazionale dei Tumori* de Milán, Italia. En los últimos años, el Gobierno Italiano a través del *Ministero dell' Università e la Ricerca Scientifica e Tecnologica*, ha subvencionado el proyecto con el fin de llevar a clínica los productos derivados de la investigación, con lo que la colaboración se ha visto ampliada al *Centro di Biotecnologia, Menarini Ricerche Sud, S.p.A.* de Pomezia, Roma (Italia) y al *Istituto di Chimica Applicata, Università di Torino*, Turín (Italia).

1.2. Inmunotoxinas: concepto y estructura

En la actualidad, una inmunotoxina puede definirse como una molécula compuesta por un anticuerpo monoclonal y una proteína con actividad citotóxica, unidas a través de un agente bifuncional que introduce un enlace entre ambas moléculas (31).

Estas moléculas híbridas, que tienen su origen en una reacción de conjugación química (15), combinan la potente actividad citotóxica de las toxinas parentales con la selectividad del anticuerpo monoclonal al que se unen (21). En algunos casos, las inmunotoxinas han sido consideradas como toxinas que presentan su ligando de unión alterado, ya que la región de la molécula que reconoce la superficie celular ha sido sustituida por un AcMo (15).

Los tres componentes de una inmunotoxina resultan importantes para la especificidad de la molécula. Así el anticuerpo monoclonal, tras la conjugación, ha de retener la capacidad de interacción con el antígeno de la superficie celular que ha servido de inmunógeno para su síntesis; el agente de unión debe unir el anticuerpo y la toxina de forma estable, sin que la molécula sufra alteraciones durante su circulación en el organismo, pero debe permitir una rápida relajación de la toxina activa cuando los inmunoconjugados lleguen a la célula diana; y, por último, la toxina ha de matar a las células por interrupción de sus procesos metabólicos esenciales (31).

Recientemente, la aplicación de la ingeniería genética a la tecnología de producción de inmunotoxinas ha permitido modificar este esquema estructural. De este modo, se han obtenido moléculas recombinantes a partir de los genes que codifican para las cadenas de las inmunoglobulinas, o para sus regiones variables, y los genes que codifican para las porciones activas de las toxinas, unidas a través de enlaces de tipo amino o de péptidos de pequeña longitud (31,32).

También en los últimos años, el concepto de inmunotoxina se ha visto ampliado ya que han sido denominadas como tales,

molécula híbridas formadas por la conjugación de la transferrina con un fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (33) o por la unión de moléculas de citocinas, como las interleucinas IL-2 (34), IL-4 (35) o IL-6 (36) a distintas toxinas.

1.3. Toxinas utilizadas en la generación de las inmunotoxinas

Las toxinas de naturaleza proteica utilizadas en la generación de inmunoconjugados, son moléculas con actividad enzimática, capaces de inhibir la síntesis de proteínas (21).

Atendiendo a su origen, estas proteínas pueden ser incluidas en tres grupos: 1) toxinas de origen vegetal, como la ricina o la gelonina, denominadas por Stirpe como RIPs ("Ribosome-inactivating proteins") (37,48); 2) toxinas de origen bacteriano, como la toxina difterica (38) o la exotoxina A de *Pseudomonas* (39) y, 3) toxinas de la familia de las aspergilinas, aisladas a partir del medio de cultivo de distintas especies de *Aspergillus* (40-42). Estos tres tipos de toxinas aparecen esquematizadas en la figura 1.1.

Aunque en principio se pensó que los miembros de cada uno de estos grupos podrían presentar una actividad enzimática distinta, todas ellas se comportan como potentes inhibidores de la síntesis de proteínas (43-47). Mientras que las toxinas de origen vegetal y las aspergilinas, inactivan los ribosomas por hidrólisis enzimática del ARNr de la subunidad mayor (43-45), las toxinas bacterianas actúan inactivando los factores de elongación por transferencia de un grupo ADP-ribosil, que resultan incapaces de llevar a cabo su función en el esquema de la síntesis de proteínas (46,47). Los tres grupos de toxinas interfieren la fase de elongación de la síntesis proteica, y afectan a la función de los factores de elongación (FEs) implicados en ella (21).

1.3.1. Toxinas de origen vegetal

1.3.1.1. Definición

Las proteínas tóxicas aisladas a partir de vegetales fueron definidas por Stirpe como "proteínas que inactivan ribosomas eucarióticos de forma enzimática, dando lugar a una subunidad 60S ribosomal incapaz de unir el factor de elongación 2 (FE-2), y por tanto, parando la síntesis de proteínas" (48). Un gran número de estas proteínas y sus características más destacadas se recogen en la tabla 1.1.

Estas toxinas han sido aisladas a partir de distintas especies vegetales pertenecientes a las familias de Fanerógamas: *Caryophyllaceae*, *Celastaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Gramineae*, *Leguminosae*, *Loranthaceae*, *Phamnaceae*, *Sapindaceae*, *Solanaceae* y *Viscaceae* (37).

Los primeros datos sobre la existencia de proteínas de esta naturaleza, fueron dados por Warden y Wadell, en 1884 (49). Estos autores aislaron la abrina a partir de las semillas de la

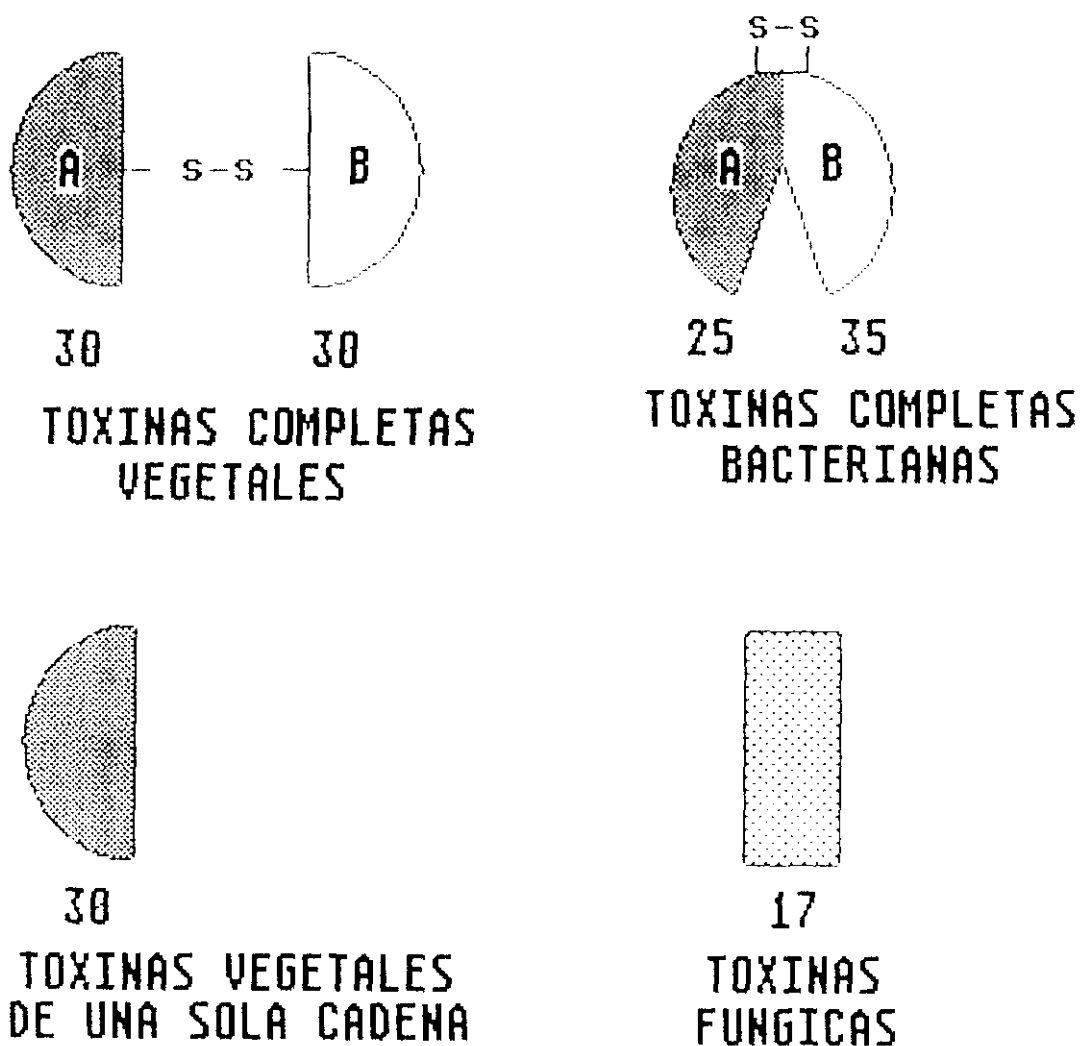


Fig. 1.1. Tipos de toxinas utilizadas en la generación de inmunotoxinas

En la figura se esquematizan, de forma simplificada, los distintos tipos de toxinas que han sido utilizadas en la síntesis de inmunotoxinas. En cada caso, se indica el peso molecular aproximado de la proteína o de cada una de sus subunidades. El esquema ha sido tomado de Hertler y Franke (21).

El peso molecular de las toxinas y de las subunidades que la componen aparece indicado en miles

leguminosa *Abrus precatorius* L., conocida vulgarmente como Jeriquiti. Dos años más tarde, Dixon (50) describe la ricina, como una albúmina tóxica presente en las semillas de *Ricinus communis* L., especie perteneciente a la familia de las Euphorbiaceas.

A partir de entonces, se han descrito gran número de principios activos considerados como sustancias de naturaleza proteica y de composición mal definida, capaces de entrar en las células vivas donde provocaban graves lesiones y que, tras su inyección en determinadas condiciones, producían la inmunización de animales con la formación de anticuerpos específicos (51). Muchas de estas sustancias, aun cuando sus efectos se conocen desde principios de siglo, todavía no han sido identificadas (51) (ver tabla 1.1.).

Estas toxinas han sido purificadas a partir de extractos acuosos de las distintas partes de la planta. Así se encuentran en los extractos de las raíces, como es el caso de la briodina de *Bryonia dioica* (52) o la volkensina de *Adenina volkensis* (53); en los extractos de las hojas, como la PAP y la PAP II de *Phytolacca americana* (54,55) o las diantinas de *Dianthus caryophyllus* (56); en las semillas, como la ricina de *Ricinus communis* (57) o la gelonina de *Gelonium multiflorum* (58), o incluso en el látex de la planta, como es el caso de la toxina de *Hura crepitans* (59).

También se han obtenido distintas toxinas a partir de una misma especie, como es el caso de la ricina y la aglutinina, aisladas de *Ricinus communis* (59), las proteínas de actividad antiviral de *Phytolacca americana*, denominadas PAP y PAP II, aisladas de las hojas de la planta (54,55,60) y PAP-S, aislada de las semillas (61) o el grupo de las isoabrininas de *Abrus precatorius* L. (62). Este hecho es extensible a otras toxinas tales como las saporinas de *Saponaria officinalis* (63), las tricosantinas de distintas especies de *Trichosanthes* (64), la briodina-L y la briodina-R de *Bryonia dioica* o las colocinas de *Colocistis colocynthis* (65), y ha permitido determinar la existencia de gran número de familias de isoenzimas dentro de las distintas especies vegetales (66) (ver tabla 1.1.).

1.3.1.2. Tipos de toxinas protéicas de origen vegetal

Atendiendo al número de cadenas polipeptídicas que componen la molécula de la toxina, estas han sido divididas en dos grupos:

1). Toxinas compuestas por una sólo cadena polipeptídica, también denominadas RIPS de tipo I (37) o hemitoxinas (21), cuyo peso molecular oscila entre 23.000 y 31.700. Estas toxinas, según apuntan Barbieri y Stirpe (37), son las más frecuentes en la naturaleza.

2). Toxinas compuestas por más de una cadena polipeptídica, también denominadas RIPS de tipo II (37) u holotoxinas (21). Estas proteínas presentan, generalmente, un peso molecular de aproximadamente 60.000 y están compuestas por dos cadenas denominadas cadena A y cadena B, de pesos moleculares equivalentes.

Han sido descritas proteínas con un peso molecular de

aproximadamente 120.000 que, como la aglutinina de *R. communis* resultan de la asociación de dos cadenas A y dos cadenas B (67) o como la aglutinina de *Momordica charantia*, descrita por Barbieri y col (68) que consta de 4 cadenas polipeptídicas cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 27.000 y 30.000 (ver tabla 1.1.).

En la cadena A de las holotoxinas reside la actividad catalítica de la molécula, mientras que la cadena B presenta actividad lectínica, responsable de la unión de la proteína a la membrana y de su traslocación al citoplasma de la célula (26).

Algunas de estas son glucoproteínas que llegan a presentar hasta más de un 30% de contenido en azúcares neutros (37). La composición de azúcares varía de forma tanto cualitativa como cuantitativa, y cuando la molécula se deglucosila parcial o totalmente, no se ve afectada su capacidad de hidrólisis (69). Por tanto, parece que ni la presencia de hidratos de carbono ni su composición influyen decisivamente en dicha actividad catalítica (37).

Las toxinas vegetales son, casi en su totalidad, de carácter básico y presentan un punto isoeléctrico comprendido entre 7.7 y 9.0 (37). En algunos casos, tales como los de la saporina y la briodina, estas proteínas han presentado valores de punto isoeléctrico superiores a 9, por lo que las técnicas estándar de evaluación no han permitido obtener un resultado concreto (52,53)(ver tabla 1.1.).

Se desconoce cuáles son las funciones que estas toxinas pueden tener dentro de la planta. Su capacidad de inhibición de síntesis de proteínas en distintos tipos de células, ha permitido postular que estas toxinas actúan sobre la regulación de dicha actividad en la propia planta, podrían inactivar ribosomas alterados, se encargarían de la protección contra parásitos o incluso, regularían la incompatibilidad entre las plantas (37).

1.3.1.3. Estructura

1.2.1.3.1. Estructura primaria

La toxina más estudiada de este grupo ha sido la ricina (61,67,70-73). Esta proteína está compuesta por dos cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas A y B de 267 y 262 aminoácidos respectivamente (70). Ambas cadenas están unidas a través de un puente disulfuro entre la Cys de la posición 9 del extremo C-terminal de la cadena A y la Cys de la posición 4 del extremo N-terminal de la cadena B que se reduce con una concentración final de 2- β -mercaptoetanol del 1% (70,71). El peso molecular de las dos cadenas fue estimado por Olsnes y Pihl (74), en 32.000 para la cadena A y 34.000 para la cadena B, aunque han sido asignados pesos moleculares distintos para ambas cadenas (59,72) (ver tabla 1.1.).

Basándose en los primeros datos aportados por Stilmark en 1889 (73), sobre la capacidad de hemaglutinación de las semillas de *Ricinus communis*, Nicolson y col (59) describen en 1974, dos lectinas aisladas por distintos procedimientos cromatográficos que denominaron aglutininas RCAI y RCAII. RCAI presentaba un peso

Tabla 1.1. Toxinas de origen vegetal

En la tabla aparecen recogidas algunas de las proteínas tóxicas purificadas a partir de distintas especies vegetales. En cada caso se especifica la especie y la parte de la planta de la que la proteína ha sido purificada, el peso molecular, el punto isoeléctrico o el carácter ácido o básico que presentan cuando dicho valor no ha sido determinado y el porcentaje de glucosilación de la molécula. En el caso de las proteínas compuestas por más de una cadena polipeptídica (página 10) aparecen indicados, junto con el peso molecular de la proteína, los pesos atribuidos a sus subunidades A y B, o de las cuatro subunidades que componen la aglutinina de *Momordica charantia*. En algunos casos, como la abrina (página 10) o las toxinas aisladas del endosperma de las semillas de gramíneas (página 13) se indica el rango en el que quedan comprendidos los distintos parámetros considerados, según recogen los autores (ref.).

toxina	origen (especie)	peso molecular	pI	glucosilacion (%)	ref.
TOXINAS CON MAS DE UNA CADENA					
ricina	<i>Ricinus</i>	66.000	5.9-8.8	5.25	72,74,77,78,86
	<i>communis</i>	54.000			
	semillas	A.30.000			
		32.000			
		B.34.000			
aglutinina	<i>Ricinus</i>	120.000	7.3	5.25	77
	<i>communis</i>				
	semillas	A.30.000			
		B.37.000			
abrina	<i>Abrus</i>	64.000	8.0-5.40	3.68-3.88	86
I-III	<i>precatorius</i>	63.000			
	semillas				
modecina	<i>Adenina</i>	57.000	9.5	2.66	53,470
	<i>digitata</i>				
	(<i>Modecca</i>	A.25.000			
	<i>digitata</i>)	B.32.000			
	raices				
PCL	<i>Phoradendron</i>	69.000	—	14.1	102
	<i>californicum</i>				
	extracto	A.31.000			
		B.38.000			
volkensina	<i>Adenina</i>	62.000	8.0	5.74	53
	<i>volkensii</i>				
	raices	A.29.000			
		B.36.000			
viscumina	<i>Viscum</i>	60.000	—	supuesta	473
	<i>album</i>				
		A.29.000			
		B.34.000			
aglutinina	<i>Momordica</i>	115.000	6.0	116 µg/mg	68
	<i>charantia</i>	30.500			
	semillas	29.000			
		28.500			
		27.000			
TOXINAS CON UNA CADENA					
PAP	<i>Phytolacca</i>	29.000	8.40	ausente	55,84
	<i>americana</i>				
	hojas				
PAP-I	<i>Phytolacca</i>	30.000	8.50	ausente	55,84
	<i>americana</i>				
	hojas				

Tabla 1.1.

toxina	origen (especie)	peso molecular	pI	glucosilacion (%)	ref.
PAP-S	<i>Phytolacca americana</i> semillas	31.000	8.45	ausente	61
PAP-R	<i>Phytolacca americana</i> hojas	29.800	≥9.5	trazas	65
PAP-C	<i>Phytolacca americana</i> células	29.000	≥9.5	ausente	472
briodina-R	<i>Bryonia dioica</i> raíces	30.000	>9.5	6.3	52
briodina-L	<i>Bryonia dioica</i> hojas	28.800	≥9.5 ¹	8.0	65
gelonina	<i>Gelonium multiflorum</i> semillas	30.000	8.15	4.46	57,84
diantina 30	<i>Dyanthus caryophyllus</i> hojas	29.500	8.65	1.56	56,84
diantina 32	<i>Dyanthus caryophyllus</i> hojas	31.700	8.55	2.34	56,84
saporina 6	<i>Saponaria officinalis</i> semillas	28.621	>9.5	ausente	58,63
saporina 9	<i>Saponaria officinalis</i> semillas	29.500	≥9.5	ausente	65
agrostina ⁽¹⁾ 2 a 6	<i>Agrostema githago</i> semillas	29.500 30.600 29.300	7.7-8.75	6.68-7.17	58
asparagina ⁽¹⁾ 2 a 6	<i>Asparagus officinalis</i> semillas	32.500	>9.5	1.42-1.20	58

Tabla 1.1.

¹⁾ Los valores recogidos por los autores se refieren al material protéico presente en las fracciones obtenidas tras la cromatografía de los extractos acuosos en CM-52 cellulose. Estas fracciones no han sido completamente caracterizadas como toxinas.

toxina	origen (especie)	peso molecular	pI	glucosilacion (%)	ref.
HCI	<i>Hura crepitans</i> latex	28.000	>9.5	39.9	58
momordina	<i>Momordica charantia</i> semillas	23.000	8.6	1.74	68,84
α -momorcarina	<i>Momordica cochinensis</i>	31.460	—	—	66
momorcochina-S	<i>Momordica cochinchinensis</i> semillas	30.000	9.0	2.82	66
momorcochina-R	<i>Momordica cochinchinensis</i> raices	30.000	básica	glucoproteína	66
melonina	<i>Cucumis melo</i> semillas	23.500	(básica)	—	475
lufina-I	<i>Luffa cylindrica roem</i> semillas	26.000	(básica)	—	116
lufina-II	<i>Luffa aegyptiaca</i> semillas	30.000	(básica)	—	365
α -tricosantina	<i>Trichosanthes kirilowii</i> raices	27.170	—	—	87,64
β -tricosantina	<i>Trichosanthes cucumeroides</i> raices	27.000	—	—	477
tricokirina	<i>Trichosanthes kirilowii</i> semillas	27.000	>9.0	1.27	474
MAP	<i>Mirabilis jalapa</i> hojas y raices	27.833	9.8	—	80

Tabla 1.1.

toxina	origen (especie)	peso molecular	pI	glucosilacion (%)	ref.
asparina 1	<i>Asparagus officinalis</i> semillas	30.500	8.7	trazas	65
asparina 2	<i>Asparagus officinalis</i> semillas	29.800	9.2	trazas	65
colocina 1	<i>Citrullus colocynthis</i> semillas	26.300	≥9.5	0.40	65
colocina 2	<i>Citrullus colocynthis</i> semillas	26.300	≥9.5	1.59	65
lichnina	<i>Lychnis chalcedonia</i> semillas	26.600	≥9.5	0.31	65
mapalmina	<i>Manihot palmata</i> semillas	26.900	≥9.5	5.99	65
tritina	<i>Triticum aestivum</i> semillas	30.000	básica	—	486
viscotoxina 3 ⁽²⁾	<i>Viscum album</i> hojas y tallos	9.739	básica	glucoproteína	483
purotioninas ⁽²⁾ β, αβ y αD	<i>Triticum aestivum</i> endospermo	5.000	básicas	—	484, 485
hordotioninas ⁽²⁾ α, β y γ	<i>Hordeum vulgaris</i> endospermo	5.000	básicas	—	487, 488
Ri 2, 3, 5 y 7 ⁽²⁾	<i>Oryza sativa</i> endospermo	11.000-17.000	—	—	488

Tabla 1.1.

²⁾ Los datos que sobre estas proteínas aportan los autores, parecen señalar que inhiben la síntesis protéica en sistemas acelulares o en célula en cultivo, a través de mecanismos distintos a los que han sido descritos para las toxinas incluidas dentro del grupo de las RIPs. En la mayoría de los casos, no ha sido descrita su actividad *in vivo*.

molecular entre 118.000 y 120.000 y RCAII entre 60.000 y 65.000. La molécula RCAI fue denominada hemaglutinina de *R. communis* y la RCAII, se comprobó que correspondía con la molécula de ricina.

Butterworth y Lord (67) atribuyen a la ricina un peso molecular de 58.000, con una cadena A de 32.000 y una cadena B de 34.700, (α, β), mientras que la aglutinina es un tetrámero formado por dos subunidades A idénticas a la de la ricina y dos subunidades B' distintas de 36.000 de peso molecular ($\alpha_2\beta'_2$).

Todas las subunidades de ambas proteínas están glicosiladas y son capaces de unirse a moléculas de galactosa, y adicionalmente, la molécula de ricina une N-acetil galactosamina. Esta capacidad de interacción con azúcares es atribuida a las cadenas B y B', mientras que la cadena A es responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas (74,75).

Se conoce completamente la secuencia primaria de la ricina (72) mientras que sólo han sido secuenciados los 70 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena A de la aglutinina (76) y los 30 del mismo extremo de su cadena B (77). Aun así, los fragmentos comparados de las cadenas A y A' resultaron idénticos, excepto en el residuo número 7, mientras que de los 30 aminoácidos comparables entre B y B', los 19 primeros desde el extremo N-terminal son distintos (76).

Funatsu y col (72,78) aislaron a partir de distintas subespecies de *Ricinus communis*, moléculas de ricina que presentaban distinto comportamiento cromatográfico en Sepharosa 4B. Estas toxinas fueron denominadas ricina E y ricina D y las diferencias entre ambas se basaron en la composición de los restos de azúcares unidos a la molécula así como en la composición de aminoácidos (78) y presentan distinto punto isoeléctrico.

Al igual que ocurre con la ricina, también han sido descritas distintos tipos de isoabrininas (62,79). En principio, fueron descritas la abrina A y abrina C, con pesos moleculares de 60.100 y 63.800, respectivamente. La abrina A se separa en dos cadenas de 32.000 y 29.550 de peso molecular, mientras que la abrina C, se separa en dos cadenas de 33.000 y 28.000, que presentan diferencias en su composición de aminoácidos basadas en el número de treoninas, glicinas, tirosinas y fenilalaninas (79). Posteriormente, Lin y col (62) aumentaron a cuatro el número de moléculas de isoabrininas aisladas a partir de las semillas de Jeriquití.

Ha sido determinada la secuencia primaria de algunas de estas toxinas, como es el caso de la proteína antiviral de *Mirabilis jalapa*, conocida como MAP (80), la tricosantina de *Tricosantus kirilowii* (64), la saporina 6 de *Saponaria officinalis* (63) y la α -momorcarina de *Momordica charantia* (81). De muchas otras, sólo se conoce parte de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la molécula (82,83).

Cuando se compara las secuencias de los 31 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de las toxinas de *Phytolacca americana*, se observa que 10 de los 29 posibles aminoácidos comparables son idénticos entre PAP y PAP-II, y 11 de los 27 comparables entre PAP II y PAP-s (83).

Similares resultados se obtienen en la comparación de la secuencia N-terminal de distintas toxinas aisladas a partir de especies pertenecientes a la familia de las Euforbiaceas, como la momordina, la briodina y la gelonina de *Gelonium multiflorum* o en la comparación de las saporinas aisladas de las hojas de *Saponaria officinalis* (82). De esta manera, sólo se han encontrado homologías estructurales entre las proteínas pertenecientes a la misma especie y, en menor grado, entre toxinas aisladas de plantas de la misma familia (82).

Estos datos fueron confirmados por estudios sobre inmunogenicidad de las toxinas. Falasca y col (84) demuestran, en experimentos en los que se estudia la reacción cruzada entre la gelonina, la momordina, la diantina 32 y la diantina 30, de *Dyanthus caryophyllus*, utilizando antisueros policlonales de conejo contra cada una de las proteínas, que sólo se observa una reacción cruzada parcial entre las dos formas de diantina, mientras que no se observa entre las demás proteínas reconocidas por sus antisueros específicos (84). Ramakrishnan y col (85) describen la ausencia de reacción cruzada entre la luffina II de *Luffa aegyptiaca* con la PAP y la cadena A de la ricina. Ha podido ser observada una reacción cruzada parcial entre la volkensina de *Adenina volkensii* y la modicina de las raíces de *A. digitata*, utilizando un antisuero de conejo específico contra la modicina (53). Recientemente, Hegde y Podder (86) evidencian la existencia de reacción parcial significativa entre la ricina y la abrina, lo que aumenta la evidencia de que ambas proteína presentan un elevado grado de similitud en su estructura primaria, como ha sido comprobado a raíz del análisis de sus correspondientes secuencias génicas.

Las toxinas vegetales de una sola cadena presentan, por norma general, un bajo porcentaje de homología en su composición de aminoácidos con la cadena A de la ricina (66). Los grados de homología descritos para esta toxina han sido de un 63% con la α -momorcarina (81), de un 34 % con la tricosantina (87), de un 24% con la MAP (80) y de un 12% con la saporina 6 (63).

1.3.1.3.2. Estructura secundaria y terciaria

Los primeros datos sobre la estructura secundaria de la ricina se deben a Funatsu y col (72), quienes analizan la cadena A o cadena Ala por el método de Chou y Fasman (88). Esta cadena presentó un 10.4% de estructura α -hélice (27 aminoácidos totales) distribuidas en 4 regiones y un 32.4% de estructura β (82 aminoácidos totales) distribuidas en 12 regiones (72).

La estructura tridimensional de la ricina fue analizada por Montfort y col (89) a partir de cristales con una resolución de 2.8 Å. Según estos autores y como se puede observar en la figura 1.2, la cadena A es una proteína globular con una estructura secundaria extensiva y un centro activo situado en posición prominente (89).

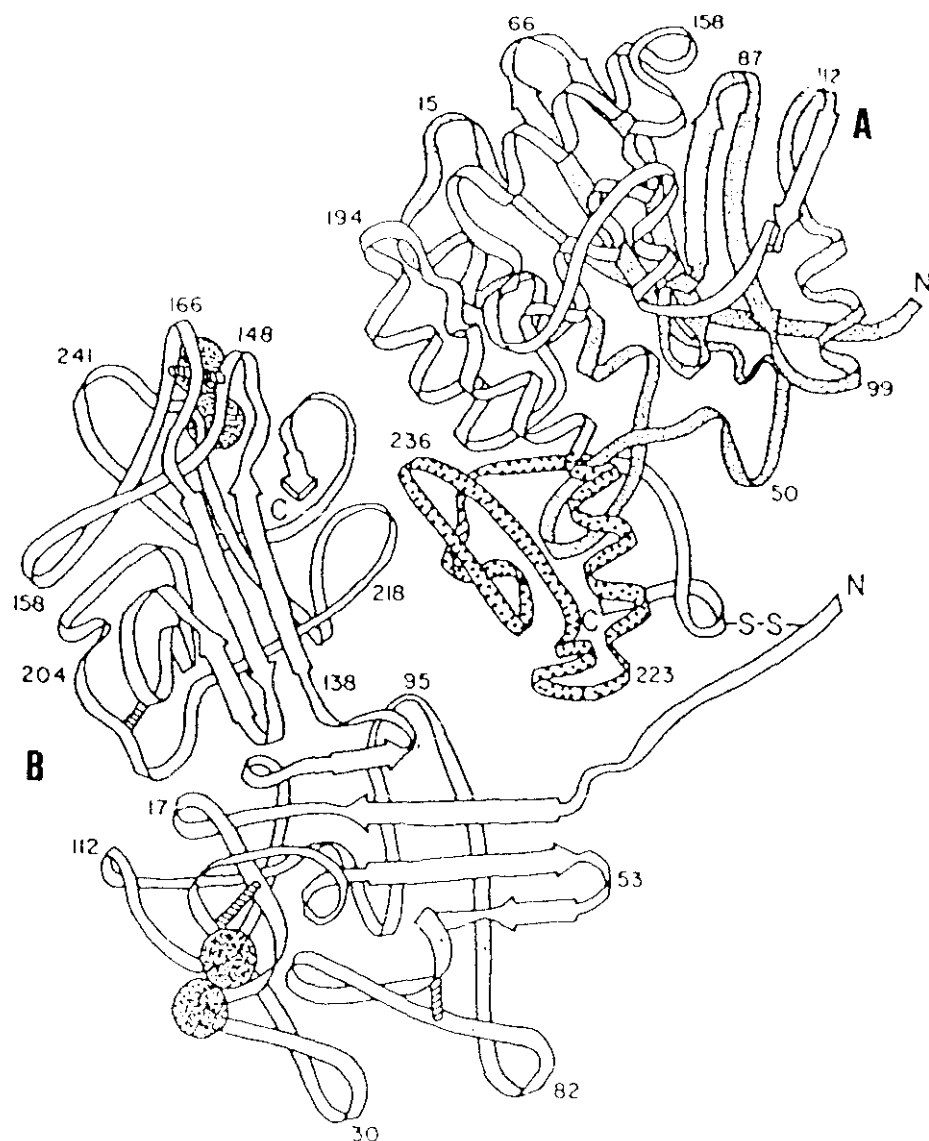


Fig. 1.2. Estructura tridimensional de la ricina

La figura ha sido tomada de Montfort y col (89), quienes describen el análisis por difracción de rayos X de los cristales de la molécula de ricina, a una resolución de 2.8 Å. Los lugares de unión de las moléculas de lactosa con la cadena B, se representan como dos discos, situados en cada parte de la molécula. La cadena A ha sido dividida en tres dominios que compenden los residuos 1 a 117, 118 a 210, y 211 a 267, respectivamente.

La cristalización de la cadena B de la ricina, analizada por espectrometría de rayos-X de alta resolución, ha permitido delimitar dos dominios, cada uno de los cuales presenta un sitio de unión de alta afinidad para galactosa, de manera que un residuo de glutamina de cada dominio forma un puente de hidrógeno con el grupo OH-4 de la molécula de galactosa (70,90). Sin embargo, no ha sido posible definir una parte de la estructura en particular a la que pueda atribuirse la función de penetración en la membrana (90).

La zona de interfase entre las cadenas A y B muestra interacciones hidrofóbicas en las que juegan un papel destacado residuos de prolina y fenilalanina (89).

El análisis por rayos-X de la cristalización de la abrina, ha permitido observar que la proteína forma cristales ortorómbicos de simetría P 2₁2₁2₁, y dimensiones a = 74,9 Å, b = 269,8 Å y c = 70,3 Å (81). Los estudios sobre la estructura tridimensional de la α -tricosantina y la cadena A de la abrina, fueron realizados por Collins y col (64) y permitieron, según afirman estos autores, llevar a cabo estudios sobre la relación estructural y funcional que existe entre este tipo de proteínas.

1.3.1.3.3. Genes que codifican para las toxinas vegetales

El gen que codifica para la ricina ha sido clonado en varias ocasiones (70,91-95). El primer clonaje fue llevado a cabo por Halling y col (70), según los cuales, este gen codifica para un precursor de 64.000 de peso molecular que contiene en el siguiente orden: un segmento que codifica para un péptido señal de entre 24 y 35 aminoácidos, la secuencia de la cadena A, 12 aminoácidos que sirven como espaciador entre ambas cadenas y la secuencia de la cadena B. Este gen, de aproximadamente 2400 bases, se traduce en un único ARNm, a partir del cual se sintetiza un precursor de 64.000 de peso molecular (96).

El gen no presenta intrones, lo cual coincide con los datos que se conocen sobre los genes que codifican para otras lectinas, como la de *Phaseolus vulgaris* (70).

La existencia de distintos tipos de ricina aisladas a partir de las subespecies de *Ricinus communis* o incluso en la misma planta, y la similitud encontrada entre las cadenas de estas toxinas y la aglutinina, permitieron asegurar a Halling y col (70), que la ricina estaba codificada por una familia de genes, de manera que la regulación a que la expresión de dichos genes está sometida, daría origen a la gran variedad molecular observada. Este hecho ha sido corroborado por Hegde y Podder (86), quienes apuntan la posibilidad de que la molécula de abrina este sometida a un proceso de control génico similar.

Han sido clonados independientemente los fragmentos que codifican para cada una de las cadenas de la molécula de ricina, obteniéndose, de esta forma, una cadena A completamente libre de cadena B (91). Así, el gen de la cadena A de la ricina ha sido expresado en *Escherichia coli*, obteniéndose moléculas activas (90), mientras que la cadena B se expresa como un polipeptido activo en células de mamíferos (92) y en hongos (93). La cadena

A de la ricina recombinante fue cristalizada, tras lo cual pudo observarse que existían cambios conformacionales entre la molécula nativa y la recombinante (94).

El gen que codifica para la cadena B de la ricina parece ser un producto de duplicación, que presenta aproximadamente un 32% de identidad entre los aminoácidos de cada una de las dos mitades que lo componen (89,95).

Posteriormente, han sido clonados los genes que codifican para la cadena A de la abrina (97), para la diantina 30 (98), la α -momorcarina (81) y la MAP (80). En todos los casos, estos genes codifican para una proteína mayor que presenta una secuencia de entre 23 a 34 aminoácidos en el extremo N-terminal, identificada como una señal de translocación vacuolar que permite la excreción de la proteína al exterior de la célula (80,81,97,98).

1.3.1.4. Actividad

1.3.1.4.1. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistemas libres de células

La actividad más estudiada en las toxinas vegetales ha sido su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas tanto en sistemas acelulares como en células intactas (37). En los primeros, las concentraciones de toxina requeridas para que esta inhibición se lleve a cabo, oscilan entre 10^{-9} y 10^{-12} M, tanto en las toxinas monocatenarias como en las compuestas por más de una cadena (37).

Las toxinas vegetales actúan sobre los ribosomas de las células eucarióticas, en los que manifiestan una actividad catalítica e irreversible, inactivando la subunidad ribosomal 60S de los ribosomas 80S de eucariotas y afectando a la fase de elongación del péptido nascente (44,99,100).

La primera evidencia de esta actividad endonucleasa fue dada por Mitchell y col en 1976 (101), en polisomas de células de distintos tipos de leucemias tratados con ricina, en los que observaron que no se modificaba el tamaño de ninguna clase de ARNr. Endo y col (100,102) comprobaron más tarde, que la ricina y otras toxinas relacionadas por su estructura y actividad, como la abrina, la modicina y la lectina de *Phoradendron californicum*, denominada PCL (102), modificaban un nucleótido del ARNr 28S.

Las cadenas A de estas toxinas mostraban una actividad N-glicosidasa, hidrolizando el enlace N-glicosídico que une la base A-4324 a la ribosa en el ARNr 28S de los ribosomas de hígado de rata (100). Esta rotura no se pone de manifiesto hasta que los ribosomas hidrolizados no son tratados a pH 4.5 con anilina, en cuyo caso se libera un fragmento de 533 nucleótidos de longitud del extremo 5' del ácido nucleico, que ha sido denominado fragmento anilínico. Al tiempo, es posible observar en el gel de agarosa, la aparición de una banda correspondiente a un ARNr 28S, ligeramente más pequeño (100).

La reacción catalizada por la anilina a pH ácido es una reacción de β -eliminación, que provoca la excisión entre los

lados 3' y 5' de la ribosa de la A-4324, dando origen a pG-4325 y un fragmento 5' terminal (43).

Esta base A-4324, está incluida en un lazo de rRNA monocatenario, altamente conservado a lo largo de la escala evolutiva, donde también se encuentra, como será referido mas adelante, el sitio de acción de las aspergilinas (45,100). La secuencia aparece también en el rRNA 23S de los ribosomas 70S de *Escherichia coli*, pero, mientras que concentraciones elevadas de ricina digieren el rRNA 23S aislado, los ribosomas completos son resistentes a la actividad enzimática de la proteína (100,103).

La ricina, la abrina y la modicina han presentado actividad también sobre el ARNr 28S desproteinizado, en el que causan la misma modificación que en la molécula nativa, aunque no actúan en los demás ácidos nucleicos presentes en el ribosoma eucariótico: 5S, 5.8S y 18S (100). Sin embargo, estas toxinas, junto con la toxina Shiga, son capaces de actuar sobre las moléculas de ARNr 5S y 5.8S que presentan alguno de sus enlaces fosfodiéster hidrolizado, dando origen a fragmentos mas pequeños (104).

Este mecanismo de actuación, descrito en las toxinas vegetales compuestas por más de una cadena polipeptídica, parece ser también el utilizado por la toxinas de cadena única, ya que ha sido descrita una actividad similar en la gelonina, la saporina, la momordina, las toxinas de la familia de las PAP, las asparinas 1 y 2 de *Asparagus officinalis*, las colicinas 1 y 2 de *Citrullus colocynthis*, la lichnina de *Lychnis chalcidonica* y la malpalmina de *Manihot palmata* (44,54,65). Todas ellas presentaron actividad N-glicosidasa en el ARNr 28S de las subunidad 60S de ribosomas eucarióticos (44,54), así como las diantinas 30 y 32 y la PAP en los ribosomas de *Escherichia coli* (105). Este hecho apoya la teoría de que las hemitoxinas presentan homología funcional con la cadena A de las holotoxinas (77,87). Según apuntan Hartley y col (105), las RIPs de tipo II, aun cuando reconocen la secuencia de corte en el ARNr 23S de *E. coli*, no son capaces de inducir la rotura del ácido nucleico.

Por otro lado, las toxinas aisladas de *Shigella* denominadas genéricamente como toxinas Shiga (29) y otras proteínas relacionadas aisladas a partir de bacterias enteropatógenas, tales como las toxinas Vero de *E. coli*, (31) han mostrado homología de acción y de secuencia con la cadena A de la ricina (106-108).

Por último, ha sido comprobado que la modificación de la base A-4324 del ARNr 28S, inducida por la ricina, hace a los ribosomas resistentes a la acción de otras ribonucleasas bacterianas como la T2 de *Aspergillus oryzae* (100,109), la U2 de *Ustilago sphaerogena* (110) y la PhyM de *Physarium polycephalum* (111), todas ellas ribonucleasas con especificidad por residuos de guanina que actúan en los alrededores de esta base (100).

1.3.1.4.2. Actividad en células

Cuando las proteínas tóxicas de origen vegetal fueron ensayadas sobre células intactas, pudieron encontrarse claras diferencias en los niveles de actividad de los dos tipos de

Tabla 1.2. Actividad *in vivo* de las toxinas vegetales

En la tabla aparecen recogidos los valores de LD₅₀, o dosis de proteína capaz de matar a la mitad de los animales inoculados, obtenidos para algunas de las RIPs (proteínas inactivadores de ribosomas) purificadas. Los ratones utilizados en estos experimentos pertenecen a la cepa Balb/c machos y hembras de entre 20 gramos y 25 gramos de peso corporal o la cepa Swiss, machos y hembras, de entre 19 gramos y 31 gramos, que son inyectados por vía intraperitoneal con distintas dosis de toxinas. Otros animales utilizados, quedan especificados al pie de la tabla. Los valores que aquí se recogen han sido tomados a partir de las referencias originales, conservando las unidades que cada autor utiliza para definir la LD₅₀; también se indica el tiempo a que dicho valor ha sido determinado.

toxina	toxicidad		referencias
	en ratones (LD ₅₀)	en otros animales (LD ₅₀)	
TOXINAS CON MAS DE UNA CADENA			
ricina D	0.2 µg/ratón 2.7 µg/Kg de peso	1.7 µg/Kg, en perro	74,86 478
aglutinina de <i>Ricinus communis</i>	2.8 µg/ratón		86
abrina	0.04 µg/ratón (3 días)		471
abrina I a III	0.550-0.006 µg/ratón		86
aglutinina de <i>Momordica charantia</i>	316 µg/100 g de peso (2 días)	>1 mg/100 g, en rata ⁽¹⁾	68
modicina	0.53 µg/100 g de peso (2 días) 0.23 µg/Kg de peso (10 días)	0.13 µg/100 g, en rata ⁽¹⁾ 0.09 µg/100 g, en rata ⁽¹⁾	472 472
PLC de <i>Phoradendron californicum</i>	100 µg/ratón		102
viscumina	48 ng/ratón (7 días)		473
volkensina	1.73 µg/Kg de peso (2 días) 1.38 µg/Kg de peso (14 días)	0.32 µg/kg, en rata ⁽²⁾ (2 días) 0.061 µg/Kg, en rata ⁽²⁾ (14 días)	53 53
TOXINAS CON UNA SOLA CADENA			
RCA ⁽³⁾	22.5 mg/kg de peso		15
gelonina	40.0 mg/kg de peso		57

¹⁾ Ratas Wistar de entre 100 g y 120 g de peso

²⁾ Ratas Sprague-Dawley de 200 g de peso

³⁾ RCA = cadena A de la ricina.

toxina	toxicidad		referencias
	en ratones (LD ₅₀)	en otros animales (LD ₅₀)	
TOXINAS CON UNA SOLA CADENA			
asparina 1	20.0 mg/kg de peso (2 días)		65
asparina 2	10.0 mg/kg de peso (2 días)		65
briodina-R	14.5 mg/Kg de peso (2 días)		52
	12.1 mg/kg de peso (7 días)		52
colocina 1	10.7 mg/Kg de peso (2 días)		65
colocina 2	12.6 mg/Kg de peso (2 días)		65
lichnina	9.3 mg/Kg de peso (2 días)		65
PAP-S	6.4 mg/Kg de peso (2 días)		83
	2.6 mg/Kg de peso (10 días)		83
PAP-R	1.2 mg/Kg de peso (2 días)		65
PAP-C	1.89 mg/kg de peso (2 días)		474
	0.95 mg/Kg de peso (14 días)		474
saporina 6	4.0 mg/kg de peso (6 días)		58
saporina 9	1.7 mg/Kg de peso (6 días)		58
malpalmina	>8.0 mg/kg de peso (2 días)		65
momordina	430 µg/100 g de peso (2 días)		68
tricokirina	8.1 mg/Kg de peso (2 días)		476

Tabla 1.2.

toxinas descritas (37). Las toxinas que presentan en su molécula una cadena con actividad lectínica, mostraron una fuerte citotoxicidad, tanto en células de tejidos normales como sobre líneas tumorales humanas donde llegan a mostrar un IC₅₀ (concentración con la que se consigue una inhibición del 50% en la síntesis de proteínas) de hasta 10⁻¹³M (53,62).

Han sido descritas actividades contra distintos tipos de tumores en todas las toxinas vegetales, tales como las descritas para la ricina sobre tumores murinos de Ehrlich en ascitis, leucemina L1210, melanoma B 16 y carcinoma de pulmón de Lewis (112-114), para las isoabrininas sobre células de sarcoma 180 (57) o para la lufina en leucemia L1210 (115).

Por otro lado, las proteínas formadas por una única cadena polipeptídica, son consideradas como proteínas no tóxicas en células intactas, ya que concentraciones entre 10⁶ y 10⁵ veces mayores que las utilizadas para la ricina, no resultan activas en células de leucemia 1210 (57,62,116). Su falta de actividad citotóxica ha sido achacada a la ausencia de una cadena o región B capaz de interaccionar con la superficie celular, así cuando se utilizaban las cadenas A de las holotoxinas, estas eran también menos activas que las moléculas completas (22).

Este hecho fue comprobado en experimentos en los que la gelonina se unió a una molécula de la lectina concanavalina A a través de un puente disulfuro (57). En este caso, la capacidad de inhibición de la síntesis de proteínas de la gelonina en células intactas pasó a ser comparable a la obtenida para la molécula de ricina (57).

Spreafico y col (117,118) demostraron, sin embargo, que proteínas como la familia de las PAP y la momordina, todas ellas de cadena única, presentaban una elevada citotoxicidad en macrófagos (117) y en linfocitos (118).

1.3.1.4.3. Actividad *in vivo*

La actividad *in vivo* de las toxinas protéicas de origen vegetal ha sido estudiada en distintos modelos animales (37,120-122). Así ha podido ser comprobado que ambos tipos de proteínas son capaces de matar animales inyectados por vía intraperitoneal o por vía intravenosa; pero, mientras las toxinas de doble cadena se manifiestan como toxinas muy activas en animales, las proteínas de una sola cadena e incluso las cadenas A de las toxinas compuestas por más de una cadena, al menos, aproximadamente unas 1000 veces menos tóxicas que las toxinas completas (37) según puede observarse en los datos recogidos en la tabla 1.2.

Los estudios realizados sobre la biodistribución y el acúmulo en tejidos de algunas toxinas, han permitido obtener distintos resultados sobre sus parámetros farmacocinéticos. Así, Fodstad y col (120) demostraron que la ricina y la abrina, inoculadas tanto por vía intraperitoneal como por vía intravenosa en ratones, se acumulaban de forma intacta en los distintos órganos.

La concentración relativa de proteína observada en órganos,

era muy elevada en el hígado, seguido del bazo, los riñones, el corazón y el timo, sin que este resultado dependiera de la vía de inyección. Ambas proteínas se encontraban digeridas en las orina (120).

Según estos mismo autores, el acúmulo de estas proteínas en el hígado podría explicarse por la presencia de restos de lactosa en su molécula, que eran rápidamente captadas por dicho órgano (120). Los motivos de la muerte de los animales no han sido aclarados, pero podría ser originada por la inhibición de la síntesis de algunas proteínas vitales para el organismo. Por otro lado, la cadena B de la ricina es capaz de presentar efectos tóxicos en otras células debido a la presencia de restos de galactosa, para los que presenta dos sitios de unión por molécula (120).

Con el fin de aumentar la vida media de la ricina en el plasma, se recurrió a utilizar la cadena A aislada (69). Pero, los restos de lactosa de dicha cadena, se fijan a las células de Kupffer del sistema retículo-endotelial del hígado, por lo que estas moléculas son retiradas muy rápidamente de la circulación (69,121).

La deglicosilación de la cadena A de la ricina, según apuntan Blakey y Thorpe (69), permitió obtener una proteína, que presentaba unos parámetros similares en cuanto a su vida media en el plasma, pero muy distintos en cuanto a su biodistribución, ya que estas moléculas no se acumulaban en el parénquima del hígado, sino que eran eliminadas rápidamente por los riñones, debido a que su peso molecular, de aproximadamente 30.000, le permite atravesar el glomérulo renal.

También ha sido estudiada el aclaramiento en la sangre de conejo de la PAP que, como apuntan Ramakrishnan y Houston (122) es eliminada muy rápidamente de la circulación, de manera que tras 2 horas permanece en circulación sólo un 5% de la proteína inoculada. Según estos autores, entre las 2 y 3 horas, la proteína sigue una cinética de primer orden, con una vida media inferior a una hora (122).

1.3.1.4.4. Otras actividades

Una de las características que ha permitido definir a las toxinas vegetales ha sido la presencia de una cadena lectina que permite la aglutinación de distintos tipos de células, entre ellas los glóbulos rojos (37). Esta actividad lectínica ha sido descrita en todas las proteínas de origen vegetal que presentan dos o más cadenas, como son la ricina (67), la abrina (59), la modicina (119), la aglutinina de *Momordica charantia* (68) o la lectina de *Phoradendron californicum* (102).

Algunas de las toxinas de origen vegetal presentan actividad antiviral, determinada como inhibición de la proliferación de distintos virus que infectan a plantas (56,61,80,116). Esta actividad ha sido descrita en PAP-s (61,116), en las diantinas (56), en la briodina (52), en la saporina (58) o en la proteína antivírica de *Mirabilis jalapa* (MAP) (80).

También ha sido descrita la capacidad de inhibición de la síntesis de ADN en células intactas de toxinas como la briodina, sobre linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina (52) o las isoabrininas (62).

Algunas de las toxinas aisladas a partir de las especies del género *Momordica*, tales como la α -momorcarina y la momorcochina-R, presentaron actividades abortivas (66,80). La primera de estas proteínas presenta también capacidad inmunosupresora al igual que ha sido descrita para la PAP-S (37,80).

1.3.2. Toxinas de origen bacteriano

1.3.2.1. Definición

Las toxinas de origen bacterianas utilizadas en la generación de inmunosupresores han sido la toxina diftérica, aislada de *Corynebacterium diphtheriae* (38), la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (39) y las denominadas toxinas de Shiga (Shiga-toxin) aisladas de *Shigella dysenterica* y de *Shigella sygheae* (106,123).

Estas proteínas se asemejan a las holotoxinas de origen vegetal en su estructura y en su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas pero, excepto las toxinas de Shiga, presentan una actividad enzimática diferente (124). En su molécula pueden distinguirse dos regiones denominadas A y B, ya que presenta actividades similares a las cadenas correspondientes de las cadenas de las holotoxinas; el dominio o región A contiene el sitio de actividad catalítica y el dominio B interacciona con la membrana celular a través de receptores específicos e induce la internalización de la toxina (38,39,123).

1.3.2.2. Estructura y actividad

La toxina diftérica y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* presentan una actividad de inhibición de síntesis de proteínas similar. Ambas toxinas catalizan la transferencia de un grupo ribosil-adenosina difosfato (ADP-Rib) al factor de elongación 2 (FE-2) de las células eucarióticas, mediando en la reacción una molécula de NAD⁺ (39). Esta transferencia convierte a dicho factor de elongación en una proteína no funcional, incapaz de interactuar con el ribosoma por lo que la fase de elongación de la síntesis proteica no puede llevarse a cabo (39).

La toxina diftérica (DTx) es una proteína de 58.341 de peso molecular con 535 aminoácidos, sintetizada por bacterias de la especie *Corynebacterium diphtheriae* que son lisogenizadas por virus de la cadena β o por fagos relacionados con ellos (125,126).

Su molécula está formada por tres dominios (127) según se deduce de los estudios de cristalización llevados a cabo con una resolución de 2.5 Å, que se corresponden con los dos fragmentos descritos anteriormente. El fragmento A o dominio catalítico, está formado por los 193 primeros residuos desde el extremo N-terminal de la molécula, y puede ser obtenido por digestión

enzimática con tripsina, en condiciones fisiológicas, tras la reducción de la proteína intacta. En este fragmento se localiza la actividad enzimática de ADP-ribosil transferasa y la región de unión con el NAD, por el que la proteína presenta una elevada constante de afinidad ($K_d=8 \mu M$) (128).

El segundo dominio abarca desde los aminoácidos 205 al 378 y es el denominado dominio transmembranal, de manera que según sugieren Choe y col (127) tiene la capacidad de insertarse dentro de la membrana citoplasmática y puede participar en la translocación de la proteína al interior de la célula.

Un tercer dominio, comprendido entre los aminoácidos 386 a 535, contiene la región de unión con el receptor presente en la membrana celular (127). La región se localiza en el extremo carboxilo terminal del dominio, de manera que la delección de los 50 primeros aminoácidos de esta parte de la proteína elimina dicha actividad de unión (129). Las moléculas deleccionadas presentan también menor actividad que la proteína nativa debido a que esta proteína pierde su capacidad de penetración en las células (31). Este dominio presenta una estructura similar a las regiones denominadas de "rollo de gelatina" de algunas proteínas tales como las inmunoglobulinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) o la exotoxina A de *Pseudomonas* (127).

En los últimos años ha sido descrita en la toxina diftérica una segunda actividad ADN nucleasa, no asociada con la actividad ADP-ribosil transferasa, que se manifiesta sobre ADN de doble hélice, es intranucleosomal y está relacionada con los mecanismos de apoptosis o muerte celular programada en los linfocitos (130,131).

La exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* es una proteína de 66.000 de peso molecular compuesta por 613 aminoácidos en la que, en principio, fueron identificados dos dominios funcionales, uno que contenía la actividad enzimática y otro en el que residía la capacidad de unión de la toxina a las membranas de las células eucarióticas (132).

En estudios posteriores, llevados a cabo por Allured y col (133), en los que fue determinada la estructura tridimensional de la proteína, analizando por difracción de rayos-X cristales de 3.0 Å de resolución, se identificaron 3 dominios: un primer dominio (I), dividido en Ia, que abarca desde el aminoácido 1 al 252 y al que se asocia la actividad de unión al receptor, y en Ib entre los aminoácidos 365 a 404; un segundo dominio (II), que comprende los aminoácidos 253-364 y que, junto con dos de las argininas del dominio I, permiten la entrada de la toxina en las células y, por último, un tercer dominio (III) comprendido entre los aminoácidos 405 a 613 que, junto con los aminoácidos 401 a 404 de dominio Ib, son responsables de la actividad catalítica (133,134). No ha sido determinada la actividad de los aminoácidos 365 a 400 del dominio Ib (135).

Según apuntan Pai y col (136), el dominio más inmunogénico de la molécula de exotoxina A es el dominio II, que es el encargado de la traslocación de la toxina al interior de la célula. Los anticuerpos contra la toxina, se producen 14 días después del tratamiento (136).

Las toxinas Shiga han sido aisladas a partir de distintas especies del género *Shigella* y todas ellas presentan una estructura similar (137). Así, por ejemplo, las toxinas de *S. shigae* están formadas, igualmente, por dos cadenas polipeptídicas con distintas actividades (137). Por un lado, la cadena A con un peso molecular de 32.225, es la responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas *in vitro*, y contiene una región sensible a la acción de la tripsina (106), de manera que esta rotura pone de manifiesto la existencia de un puente disulfuro intracatenario entre dos fragmentos denominados A₁ y A₂ (123). La cadena B tiene un peso molecular de 7.671 (137). Ambas moléculas se unen en una holotoxina compuesta por una cadena A y cinco cadenas B, unidas a través de puentes disulfuro a la región A₂ (123,137).

En 1988, Endo y col (107) demostraron que tanto las toxinas de *S. dysenteriae* como las toxinas Vero, aisladas de distintas cepas de *Escherichia coli*, eran capaces de inactivar la síntesis de proteínas en ribosomas eucarióticos con una actividad similar a las proteínas tóxicas de origen vegetal, hidrolizando el enlace N-glicosídico de la adenina de la posición 4324 en el ARNr 28S de polisomas de hígado de rata. Se detectó igualmente la aparición de un fragmento de 553 nucleótidos de ARN cuando los ribosomas digeridos son tratados con anilina a pH ácido (107).

Han sido clonados los genes de la toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxinas de *Shigella* y otras proteínas asociadas a estas (124).

1.3.2.3. Actividad en células

Todas las toxinas bacterianas presentan capacidad de inhibición de la síntesis de proteínas en células intactas, de manera que su nivel de citotoxicidad es comparable al observado en las toxinas de origen vegetal compuestas por más de una cadena (69,106,123,138).

La toxina diftérica es capaz de inhibir la síntesis de proteínas no sólo en células eucarióticas sino también en arqueobacterias (139), lo que demuestra que el mecanismo de traslocación y los factores de elongación implicados en la síntesis de proteínas en las células eucarióticas y en arqueobacterias son sistemas claramente relacionados (139,140).

1.3.3. Entrada en células de las toxinas vegetales y bacterianas

De algunas de las toxinas estudiadas hasta el momento, se conoce el mecanismo de entrada en las células (124).

Estas proteínas interaccionan con receptores celulares específicos, tras lo cual sufren procesos de endocitosis similares a los que tienen lugar en la entrada de los virus y de otras moléculas tales como la transferrina, el factor epidérmico de crecimiento (EGF) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), para los que la célula presenta receptores específicos (141).

Los receptores para la cadena B de la ricina y de la abrina

son los residuos de galactosa de glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular (141). Cada cadena B de la ricina tiene dos sitios de unión para galactosa (142).

La toxina diftérica y la exotoxina A de *Pseudomonas* tienen como receptores proteínas pertenecientes a un grupo de moléculas con una homología muy estrecha, de aproximadamente 150.000 de peso molecular (143,144) mientras que la toxina de *Shigella* se une a glicolípidos que contienen secuencias Gal α 1-4 Gal. (145,146).

La unión de la toxina diftérica a su receptor está mediada por los aminoácidos del extremo C-terminal de su cadena B y en ella están implidadas las serinas de las posiciones 508 y 525 (145). También ha sido demostrada la importancia de la lisina de la posición 57, y de los aminoácidos 225 a 252 de la exotoxina A de *Pseudomonas* en la actividad de unión con el receptor (147).

Tras la unión de las toxinas a sus receptores específicos estas moléculas son internalizadas por procesos de endocitosis (124), precedidos de fenómenos de agrupamientos de los receptores en zonas específicas de la membrana, denominados "coated pits" como en el caso de las toxinas bacterianas (148) o sin que sea necesario que esto ocurra, como en el caso de la ricina (149).

Mientras que la molécula de ricina (150), su cadena A (151) y la toxina diftérica (152) son internalizadas por completo, sólo lo hace un fragmento de 37.000 de peso molecular desde el extremo carboxilo terminal de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (153).

Sin embargo, no todas las toxinas entran en las células por procesos de endocitosis. Así, la internalización de la viscumina de *Viscum album* no se ve afectada cuando las células son tratadas con agentes como la 2-desoxiglucosa o la azida sódica, que inhiben este tipo de procesos (154). Ha sido descrita la necesidad de iones de calcio en el medio de cultivo para que algunas toxinas, tales como la ricina, la abrina, la modicina, la toxina diftérica y la viscumina lleven a cabo su efecto citotóxico (154,155).

1.3.4. Estudio de la actividad citotóxica de las toxinas vegetales y bacterianas

Tras la internalización, las toxinas son transportadas en endosomas, hasta los distintos orgánulos citoplasmáticos (124), de manera que las toxinas siguen rutas distintas dentro de la célula.

Los estudios realizados por Youle y Colombatti (156) en células de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra el centro activo de la ricina, demuestran que cuando la temperatura del interior de la célula se hacía disminuir hasta los 19°C, temperatura a la cual el transporte a través del aparato de Golgi se encuentra bloqueado, el efecto de intoxicación de la ricina se reducía sensiblemente. Estos datos fueron confirmados por van Deurs y col (157) quienes afirmaron que aproximadamente un 5% de la ricina es transportada a través de las cisternas del Golgi, entrando en la ruta de síntesis de las

moléculas que se exportan fuera de la célula, mientras que el resto de las moléculas acaban siendo digeridas en los lisosomas.

Hudson y Grillo (158) demuestran en linfocitos incubados en presencia de brefeldina-A (BFA), un metabolito de origen fúngico que bloquea la función del Golgi, que tanto la acción de la ricina como la de la modicina y la abrina se ven inhibidas, por lo que deducen que es necesaria que las funciones del Golgi estén inactivas para que se lleve a cabo el procesamiento de las holotoxinas, mientras que no ocurre lo mismo con la traslocación de la molécula a través de la membrana.

Sin embargo, la toxina diftérica desarrolla su actividad de inhibición de la síntesis de proteínas desde las vesículas endosómicas, sin necesidad de llegar al Golgi (124).

Todo este proceso de movimiento de las toxinas por los distintos orgánulos del citoplasma celular, ha de ir acompañado de fenómenos de traslocación de las proteínas a través de las membranas de dichos orgánulos (124). Estos mecanismos de traslocación de las toxinas a través de las membranas de los distintos divertículos intracitoplasmático, sólo ha sido determinado para la toxina diftérica (159).

Según describen Moskaug y col (160), el factor que desencadena la traslocación de la toxina diftérica es la acidificación de los endosomas, debido a la acción de la bomba de protones dependiente de ATP que se encuentra en las membranas de las vesículas endocitóticas. Así, cuanto el interior de estas vesículas se acidifica hasta un valor de pH de 5.3, considerado como valor crítico, tiene lugar un cambio conformacional en las regiones hidrofóbicas internas de la cadena B de la toxina que se encuentran en la zona de contacto con las membranas de las vesículas (160).

Dichas regiones de contacto son expuestas e insertadas en la membrana de la vesícula y, simultáneamente, el fragmento A de la toxina es traslocado al citoplasma (160), en donde el valor de pH es entre 1 y 1.5 unidades mayor, lo que permite que la cadena A vuelva a plegarse.

Pero los fenómenos de acidificación no siempre permiten explicar estos procesos. Así, agentes que provocan la acidificación del interior de la célula, como el NH_4Cl o el ionóforo monensina, protegen a la célula de los efectos de la modicina y de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que el efecto de la ricina aumenta en presencia de dichos agentes (124).

1.3.5. Toxinas de origen fúngico: Aspergilinas

1.3.5.1. El género *Aspergillus*

1.3.5.1.1. Introducción histórica

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por Micheli en su obra *Nova Plantarum Genera* (161), pero no es hasta la mitad de este siglo cuando estos hongos comienzan a ser reconocidos como agentes implicados en procesos de descom-

posición del suelo, como causantes de enfermedades en el hombre y en otros animales, como agentes capaces de producir ciertos ácidos orgánicos y otros metabolitos de gran valor económico y como instrumento para la investigación de procesos fisiológicos y patrones metabólicos en microorganismos (162).

Los *Aspergillus* han acompañado siempre al hombre en los distintos acontecimientos científicos, así antes de la aparición del microscopio, habían sido considerados como mohos blancos, verdes, rojos o negros sin que se hiciera de ellos una interpretación más seria.

El primero en distinguir entre "tallos" y "cabezas de esporas" fue Micheli (161). La organización desde una estructura central de las cadenas de esporas o columnas radiadas le hacen recordar, como sacerdote que era, al "aspergillum", de aquí que elija el nombre de *Aspergillus* para denominar a los mohos que había observado. De esta forma, empieza a utilizar frases latinas para describirlos; por ejemplo denomina *Aspergillus capitatus*, *capitulum glauco* a una forma globosa verde o *Aspergillus capitatus*, *capitulum pullo* a algunos miembros del grupo de *Aspergillus niger*. Algunos de estos nombres han sido utilizados después como nombres específicos por distintos investigadores que han atribuido la descripción a Micheli, como es el caso de *A. capitulum pullo* (Micheli) Haller (162).

Las revisiones mas destacadas hechas del género *Aspergillus* desde su identificación se deben a Thom y Church, en 1926, en su obra *The Aspergilli*, en donde se recogen 69 especies divididas en 11 grupos; a Thom y Raper, en *A manual of the Aspergilli* en 1945, con 80 especies y 10 variedades clasificadas en 14 grupos y , la última revisión de Raper y Fennell, *The genus Aspergillus* en 1965, en la que se describen 132 especies y 18 variedades descritas en la literatura o descubiertas en su laboratorio y clasificadas en 18 grupos (162).

1.3.5.1.2. Clasificación del género *Aspergillus*

La clasificación de las distintas especies del género *Aspergillus* resulta compleja debido a la alternancia de ciclos reproductivos dentro de un mismo organismo (162,163). De esta forma, algunas especies presentan ciclos de reproducción sexual con el desarrollo de ascosporas incluidas en cleistotecios (163), que han sido descritos independientemente de la fase asexual. Este hecho condujo a que, desde un principio, se identificaran los estados asexuales con ciertas especies conocidas de distintos géneros como *Eurotium*, *Sartorya* o *Emericella* e incluso *Penicillium* (161).

Thom y Raper, en 1945, consideraron que el nombre genérico de *Aspergillus*, podía ser aplicado a todos estos hongos, produjeran o no fase ascospórica (162). Según estos autores, para llevar a cabo la clasificación de estos hongos, era necesaria establecer dos condiciones: 1) encontrar y describir la fase sexual del hongo permite una completa caracterización del mismo, y 2) es necesario establecer limitaciones entre numerosos *Aspergillus* que desarrollan una fase sexual y aquellos que no la desarrollan (162).

En las distintas clasificaciones que se han realizado del género *Aspergillus*, sus especies siempre ha sido incluidas en la clase *Ascomycetes* y han sido considerados como hongos imperfectos según queda recogido en la figura 1.3. (162,163). Así mismo, existen gran número de sinónimos con los que se han denominados a muchas especies de este género.

1.3.5.1.3. Descripción y morfología

Ya que pocas de las especies de *Aspergillus* producen cleistotecios y ascosporas, una de las bases de su identificación son las características de sus colonias y el detalle de la morfología de sus esporas (162).

Para hacer la descripción de las colonias es necesario especificar la composición del sustato en el que el hongo crece, la temperatura de incubación, las condiciones de iluminación y la edad de los cultivos. Bajo condiciones conocidas y uniformes de cultivo, han de ser tenidas en cuentas características como el color de las partes aéreas de las colonias, la pigmentación del micelio basal y de las zonas que rodean al micelio, el promedio de crecimiento y el diámetro de las misma a un tiempo específico, el margen y la textura de la superficie de crecimiento e, incluso, el olor (162).

Otras dos características que han permitido identificar las distintas especies del género *Aspergillus* son la zonación y la aparición de fenómenos de coremia. La zonación se manifiesta como un crecimiento del micelio en forma de anillos concéntricos, en los que se alternan zonas de estructuras conidiales amontonadas y zonas de crecimiento disperso o nulo. En muchas especies, esta zonación supone un crecimiento alterno de las distintas estructuras del hongo, así en las especies que desarrollan cleistotecios, las zonas representan áreas de producción alterna de cabezas conidiales y cleistotecios. Este fenómeno puede responder a una deplección periódica de nutrientes, a una producción alterna o un gradual acúmulo de metabolitos, o a las condiciones de iluminación.

La coremia se identifica con la agregación de conidióforos erectos, y sólo ha sido descrita en *A. vitellina*, en el que aparece cuando el hongo se cultiva en sustratos naturales. Sin embargo, estructuras similares han sido encontradas en la especie *A. clavato-flavus* (162).

Cuando los cultivos de *Aspergillus* son observados al microscopio, presentan un micelio basal formado por hifas difusas, ramificadas, anastomosadas, sectadas, incoloras o casi incoloras, pero oscuras (164).

El ciclo asexual del hongo comienza con la diferenciación de las células pie. Estas son células del micelio que sufren un alargamiento y un engrosamiento de su pared, y desarrollan, en su parte media, un único conidióforo como una rama perpendicular al eje longitudinal de la célula (165).

Este conidióforo dará origen, en su extremo, a la cabeza

Fischer, en *Engler and Prantl*, Teil I, Abt. 1, pp. 301-304, (1897).

Clase: *Ascomycetes*
Orden: *Plectascineae*
Familia: *Aspergillaceae*
Género: *Aspergillus*

Lindau, en *Engler and Prantl*, Teil I, Abt. 1, pp. 415-416, 430 (1900).

Clase: *Fungi imperfecti*
Orden (?): *Hyphomycetes*
Familia: *Mucedinaceae*
Subfamilia (?): *Aspergillae*
Género: *Aspergillus*

Bessey, en *Morphology and Taxonomy of Fungi*, pp. 322-326, pp. 586-587 (1950).

Clase: *Ascomycetes*
Orden: *Aspergillales (Plectascales)*
Familia: *Aspergillaceae*
Género: *Aspergillus (Eurotium)*

Clase: *Fungi imperfecti*
Orden: *Moniliales (Hyphomycetes)*
Familia: *Moniliaceae*
Género: *Aspergillus*.

Alexopoulos, en *Introductory Mycology*, pp. 271-278, Figs. 100-102: pp. 407-410 (1962).

Clase: *Ascomycetes*
Subclase: *Euascomycetidae (Series: Plectomycetes)*
Orden: *Eurotiales*
Familia: *Eurotiaceae*
Género: *Aspergillus (Eurotium, Sartorya, Emericella)*

Clase: *Deuteromycetes*
Orden: *Moniliales*
Familia: *Moniliaceae*
(Género): *Aspergillus*

Fig. 1.3. Distintas clasificaciones del género *Aspergillus*

En la figura se recogen las distintas clasificaciones hechas del género *Aspergillus*, realizadas por diversos autores. En todos los casos, los miembros de este género han sido incluidos entre los miembros de la clase *Ascomycetes* y considerados como hongos imperfectos debido a que no siempre es posible describir el ciclo sexual de las especies. Así mismo, han sido incluidos en otros géneros como *Eurotium*, *Sartorya* y *Emericella*, incluso en *Penicillium*. Este esquema ha sido tomado de Raper y Fenell (1962).

conidial. En la mayor parte de las especies de *Aspergillus*, el conidióforo no está ramificado, sin embargo, pueden observarse un número limitado de ramas en *A. cervinus*, *A. glaucus* y *A. wentti*, donde puede ser sectado o no sectado.

Las vesículas o cabezas conidiales aparecen normalmente en la parte alta del conidióforo como estructuras de forma globosa, hemiesférica, elíptica o alargada a modo de clavo. En especies como *A. cervinus* y *A. fumigatus* pueden formar un cierto ángulo con respecto al eje medio del conidióforo. Sobre estas vesículas, en las zonas que ha sido consideradas como áreas fértiles, se desarrollan las esterigmatas o células capaces de producir las esporas o conidias.

Las esterigmatas se desarrollan normalmente de forma simultánea y, aproximadamente, perpendiculares a su punto de origen. Pueden estar formadas por una sola capa de células, en cuyo caso se denominan esterigmatas uniseriadas o *prophialides*, o dar origen a una serie de esterigmatas secundarias denominadas ramas, *phialides* o pseudoesterigmatas, en cuyo caso se habla de esterigmatas biseriadas.

Cada una de las esterigmatas da origen a una cadena no ramificada de conidias o esporas, que consiste en una serie de varios cientos de secciones equivalentes producidas por gemación de una esterigmata y separadas unas de las otras por un septo. Las esporas siguen tomando los nutrientes de la célula parental hasta que alcanzan su tamaño y forma característicos y permanecen unidas entre sí por un puente conector, que puede ser imperceptible. Todas las características descritas se observan en las figuras 1.4. y 1.5.

La reproducción sexual se desarrolla con la formación de cleistotecios en las especies incluidas en los grupos *A. glaucus* y *A. fumigatus* y en algunas especies de los grupos *A. ornatus*, *A. cremeus* y *A. ochraceus* (162). Estos cleistotecios tienen forma esferoidal, con peridio y ascas globosas dispuestas de forma irregular. Cada una de las ascas contiene 8 esporas o ascosporas con forma de lente biconvexa (164).

Los cleistotecios de *A. nidulans* presentan una cubierta característica formada por células de aspecto vesiculoso que presentan las paredes muy engrosadas y que han sido denominadas células de Hülle (162). La función de estas células no ha sido determinada, Schwartz en 1928, habla de estas como estructuras con capacidad de germinación (162).

1.3.5.1.4. Condiciones de cultivo, distribución y aplicaciones de las especies del género *Aspergillus*

Las distintas especies de *Aspergillus*, pueden encontrarse en los suelos de todo el mundo, a excepción de los más fríos. Estos hongos son capaces de crecer en todos los sustratos, aunque para su determinación son cultivados en agar de Czapek-Dox (166-168).

Son muy pocas las especies que no crecen en este medio de cultivo, en cuyo caso se recurre a medios como el Agar-Malta (169) o a métodos específicos de esporulación para las especies

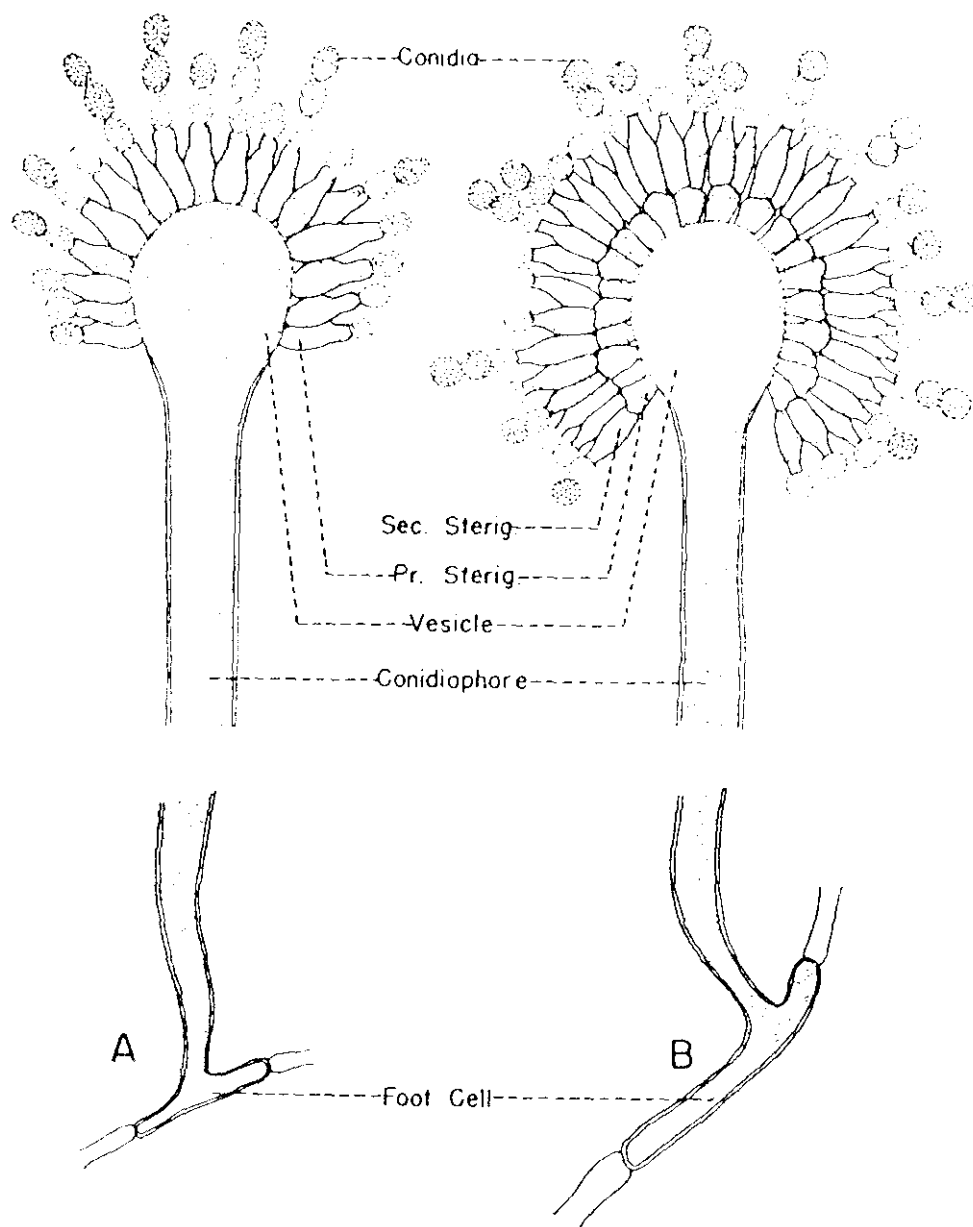


Fig. 1.4. Estructura de los conidióforos de *Aspergillus* spp

En la figura aparece representada la estructura de los conidióforos de *Aspergillus* spp. El esquema ha sido tomado de Raper y Fenell (162). En A se representa un conidióforo en el que las conidias se disponen sobre una única serie de células o esterigmata primaria (Pr. Sterig.), mientras que en B se representa un conidióforo con esterigmata secundaria, constituida por dos series de células (Sec. Sterig.). La descripción de las demás estructuras representadas se recoge en el apartado 1.3.5.1.3. y se designan de la siguiente forma: célula pie (Foot Cell), conidióforo (Conidiophore), vesícula o cabeza conidial (Vesicle), conidias o esporas (Conidia).



Fig. 1.5. Detalle de la cabeza conidial de *Aspergillus*

En la fotografía se recoge una cabeza conidial de *A. flavus* a microscopia óptica. En ella puede observarse como, al final del eje del conidióforo, se sitúa la cabeza conidial a modo de ensanchamiento. La cabeza conidial da lugar a las esterignatas, en cuyo extremo maduran las esporas que en esta especie son redondeadas y ligeramente achatadas en el extremo apical.

de *A. niger* o *A. flavus* (162).

La mayoría de los *Aspergillus* se cultivan a una temperatura de aproximadamente 25°C. Algunas especies, como las del grupo de *A. fumigatus*, pueden crecer a temperaturas elevadas, incluso a 45°C (162).

Muchos de estos hongos, producen micotoxinas de acción neoplásica y degenerativa como las aflatoxinas de *A. flavus*, o causan micosis en insectos, animales superiores e incluso en el hombre y pueden aparecer infectando alimentos (164). Estos hongos, especialmente los miembros del grupo de *A. fumigatus*, están implicados en procesos infecciosos que afectan a las vías respiratorias de los humanos, como en los casos de aspergiloma, aspergilosis aguda o aspergilosis invasiva (170,171).

Las especies de *Aspergillus* han sido utilizadas industrialmente como productoras de metabolitos primarios tales como el ácido cítrico, y de enzimas como la glucoamilasa, de las que ha llegado a detectarse concentraciones de hasta 20 gramos por litro de medio de cultivo (172,173).

Estos hongos ofrecen la posibilidad de obtener grandes niveles de producción de distintos metabolitos que son secretados al medio de cultivo. Por esto, pueden ser utilizados como vehículos de expresión de proteínas recombinantes debido a la eficiencia de su aparato secretor (174).

El reciente desarrollo de los vectores para clonaje en *Aspergillus*, ha permitido la introducción y expresión de un gran número de genes heterólogos en distintas especies (174-177). Así, han sido expresados los genes de la IL-6 (176) y la α -sarcina (177) en *A. nidulans* o enzimas como la lisozima de clara de huevo en *A. niger* (174).

1.3.5.1.5. *Aspergillus restrictus*

La primera cita bibliográfica de esta especie del género *Aspergillus* se debe a Smith, en 1931 (178), en un trabajo en el que se identificaban los hongos que causan el enmohecimiento del algodón.

Las colonias de estas especies llegan a alcanzar, en agar de Czapek-Dox, 1 cm de diámetro en 10 días. Dichas colonias son rugosas y abombadas con los márgenes divididos y presentan el envés de color verde oscuro. Cuando los medios de cultivo se enriquecen con 20% de sacarosa el crecimiento es mucho más rápido.

Los conidióforos son abundantes, sinuosos, incoloros o verdosos y miden entre 6 y 12 mm. Sólo llevan esterigmatas en la parte superior, dispuestas en una única serie y de dimensiones de 5 a 10 μ m por 2 a 3.5 μ m.

Las esporas son cilíndricas o elípticas, piriformes, rugosas, de color verdoso y miden de 4 a 5 μ m por 3 a 3.5 μ m. Las cabezas conidiales presentan cadenas de esporas largas que llegan hasta los 500 μ m de longitud.

Su distribución es cosmopolita, pero se encuentran en muy raras ocasiones en terrenos cálidos, y crecen a 25°C. Como ha sido referido en principio, son los responsables del enmohecimiento del algodón y causan daños en otros cultivos vegetales tales como en las semillas de sorghum? o de la cebada (162,178).

Hacia los años 60, se asoció la presencia de *A. restrictus* con procesos de aspergilosis en sastre mayores de 50 años (162). Algunas de los miembros de este grupo han sido identificados como patógenos en cerdos de Guinea y en ratones, mientras que en conejos sólo producen lesiones transitorias de 5 a 7 semanas de duración (162). Ha sido descrito como productor de las sustancias anticancerígenas mitogillina y restictocina (45,164,179).

1.3.5.1.6. *Aspergillus giganteus*

Las distintas cepas de la especie *Aspergillus giganteus* son incluidas en el grupo de *A. clavatus* (162). Los primeros datos que aparecen en la literatura sobre esta especie se deben a Wehmer en 1901 (180).

Las colonias sembradas en agar de Czapek-Dox, crecen rápidamente entre 24 y 26°C, a razón de 5.0 a 6.0 cm entre los 10 días y las 2 semanas. Estas colonias se caracterizan por presentar una extensa superficie con zonación y un micelio vegetativo sumergido. A partir del micelio superficial se desarrollan dos tipos de conidióforos, un primer tipo de 2 a 4 mm de longitud, más numerosos y de desarrollo mas rápido, y un segundo tipo de conidióforos, menos numerosos que tienen entre 1 y varios centímetros de longitud que presentan mayor fototropismo y, generalmente, son mas abundantes en las áreas marginales de la colonia.

Normalmente, la parte central de la colonia se oscurece. Estas, en principio, son de color blanco y se colorean ligeramente de azul verdoso que se convierte en color verde oliva cuando maduran las cabezas conidiales.

Las cabezas conidiales, se presentan en su madurez divididas en dos o mas columnas extendidas a lo largo de la vesícula que son fértiles en toda su extensión. Las vesículas suponen una extensión de los conidióforos que van desde 30 a 50 µm y de 100 a 250 µm en los conidióforos cortos, y de 120 a 250 µm y de 400 a 600 µm en los conidióforos largos, dependiendo de la cepa.

Las esterigmatas se disponen en una única serie de 3.0 a 4.0 µm por 2.5 a 3.0 µm en la base de la vesícula, y 6.0 a 8.5 µm por 2.8 a 3.5 µm en el ápice. Las esporas o conidias son elípticas y pequeñas, con un muro estrecho y dimensiones de 3.5 a 4.5 µm por 2.4 a 3.0 µm.

Algunas de las cepa de *A. giganteus* han sido consideradas por distintos autores como *A. clavatus* (181). Raper y Fenell (162) aseveran que, cuando las condiciones de cultivo se alteran, los cultivos de *A. giganteus* se parecen a los de *A. clavatus*.

A partir de estos hongos ha sido posible aislar sustancias

tales como el ácido gígántico (182), una sustancia similar a la penicilina, que presenta actividad contra *Staphylococcus* (183,184). También han sido utilizados en la síntesis de complejos similares a la lignina (185) y de esteróides (186).

1.3.5.2. Definición de las aspergilinas

Las aspergilinas pueden definirse como un grupo de proteínas tóxicas aisladas a partir del medio de cultivo de distintas especies del género *Aspergillus* (40-42,179), que son capaces de inhibir la síntesis de proteínas en células eucarióticas y procarióticas por inactivación enzimática de los ribosomas (187).

En los últimos años, algunos autores han considerado a las aspergilinas como proteínas incluidas en el grupo de las RIPs de tipo I de origen vegetal, debido a que presentan una actividad comparable a estas (188,189).

La primera proteína purificada de este grupo fue la α -sarcina (40). Esta proteína fue descrita en un principio por Olson y Goerner en 1956 (40) como una sustancia presente en el medio de cultivo de un hongo que era capaz de inhibir el desarrollo de tumores en ratones, entre ellos el sarcoma 180 y el carcinoma 755 (40,41).

El hongo fue clasificado en 1960 por Beneke, de la Universidad del estado de Michigan, como una cepa de *Aspergillus giganteus*, la MDH 18894 (40), y la sustancia aislada de su medio de cultivo se identificó como una pequeña proteína de carácter básico, a la que denominaron α -sarcina por su capacidad de inhibir el crecimiento de las células del sarcoma 180 (40,41).

Unos años más tarde, fueron descritas otras dos proteínas que presentaban iguales características en los medios de cultivo de dos cepas de *A. restrictus*: la restrictocina de la cepa ATCC 34475 y la mitogillina, de la cepa denominada en principio MDH 17070, y clasificada posteriormente como NRRL 3050 (42,179). Entre los años 1963 y 1966, el grupo de Olson, patentó los métodos de obtención y purificación de la α -sarcina (190) y de la mitogillina (191).

Estas proteínas despertaron un gran interés en los años 60 debido a su posible utilización clínica como agentes antitumorales (41,179). La aplicación terapéutica en modelos animales no tuvo el éxito esperado y durante una década se abandonó su estudio.

La investigación sobre las toxinas de *Aspergillus*, fue retomada a finales de los años 70 y principio de los 80 por bioquímicos y biólogos moleculares, que encontraron en ellas un buen instrumento para distintos estudios; sin embargo, la actividad antitumoral que Olson y sus colaboradores encontraron en estas proteínas no volvió a ser revisada y los datos de las razones que impedían su utilización en humanos nunca han sido publicados (40-42,179).

El estudio de los antígenos mayoritarios presentes en extractos realizados a alta fuerza iónica del micelio de *Asper-*

gillus fumigatus (170), ha permitido la caracterización parcial de un antígeno de aproximadamente 18.000 de peso molecular, determinado en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS, que origina en pacientes afectados de enfermedades respiratorias causadas por el hongo, una elevada respuesta IgE (170). Este antígeno, denominado Asgf-I, del cual ha sido analizada parte de su secuencia de aminoácidos presenta una alta homología con la mitogillina, lo que ha permitido pensar que dicho antígeno puede tener actividades similares a las descritas en las aspergillinas (170,477).

1.3.5.3. Aislamiento y purificación

Cuando Olson y col (40,41) estudiaron las condiciones en las que el *Aspergillus giganteus* MDH 18894 producía la α -sarcina, llevaron a la conclusión de que eran necesarios requerimientos nutricionales específicos en el cultivo (41). De esta manera, pequeñas variaciones en la composición del medio en cuanto a las fuentes de carbono y de nitrógeno, podían bloquear la síntesis de la toxina, potenciando la producción de un amplio espectro de antibióticos (41).

Sin embargo, la producción de α -sarcina por parte del hongo era altamente reproducible cuando el cultivo se llevaba a cabo con un medio de igual composición y en similares condiciones (41). Estos resultados fueron confirmados posteriormente por distintos autores que han intentado poner a punto la producción de la proteína (192).

La purificación de la proteína se realizaba a partir del medio de cultivo del hongo el cual, tras eliminar el micelio, era filtrado a través de dos resinas de intercambio iónico, denominadas Amberlita IRC50 y Amberlita XE64; a partir de la elución de la segunda Amberlita se obtenía la proteína (40). Este método de purificación fue aplicado también a la mitogillina y a la restrictocina (191).

1.3.5.4. Estructura

1.3.5.4.1. Estructura primaria

Los primeros datos aportados por Olson y Goerner (40) sobre la α -sarcina fueron que esta era una proteína con un peso molecular de aproximadamente 16.000 y resultaba ser estable entre pH 2 y pH 7.

Cuando se llevó a cabo el análisis de las tres proteínas (193-195), la composición de aminoácidos resultó ser homóloga entre ambas y prácticamente idéntica entre restrictocina y mitogillina (196). Se encontraron ligeras diferencias entre estas dos proteínas y la α -sarcina, relacionadas principalmente con los contenidos en lisina, treonina y alanina, así como con la carencia de metionina en la α -sarcina. Las tres proteínas son ricas en ácido aspártico, asparagina, lisina y prolina (196).

La α -sarcina está compuesta por una única cadena polipeptídica de 150 residuos que contiene dos puentes disulfuro

situados entre las cisteínas 6-148 y 76-132 (193). La restrictocina y la mitogillina tienen una secuencia de 149 residuos y también contienen dos puentes disulfuro en posiciones equivalentes, entre los aminoácidos 5-147 y 75-131 (194,195). En ninguna de las proteínas aparecen cisteínas libres y los pesos moleculares calculados a partir de las secuencias son de 16.987 para la α -sarcina, de 16.867 para la mitogillina y de 16.836 para la restrictocina (193-195).

La secuencia de la mitogillina y de la restrictocina se diferencia en un solo aminoácido situado en la posición 25, mientras que la secuencia de la α -sarcina presenta una homología de aproximadamente el 86% con respecto a las otras dos proteínas (194,195) así, cuando las secuencias de la mitogillina (149 aminoácidos) y de la α -sarcina (150 aminoácidos) son alineadas, según se recoge en la figura 1.6., sólo se encuentran diferencia en 20 aminoácidos, distribuidas en tres regiones (195), mientras que son 21 las diferencias entre la restrictocina (149 aminoácidos) y la α -sarcina (194).

1.3.5.4.2. Estructura secundaria y terciaria

Los coeficientes de extinción $E_{0.1\%,280\text{nm},1\text{cm}}$ calculados por Gavilanes y col (196) son de 1.34, 1.34 y 1.35 para α -sarcina, restrictocina y mitogillina respectivamente.

La estimación de la estructura secundaria por el método de Chen y col (197) presentada en el mismo trabajo, proporcionó idénticos resultados para las tres proteínas, que fueron de un 38% de hélice alfa, 32% de estructura beta y 30% de ordenación aperiódica (196). En estudios posteriores llevados a cabo por Martínez del Pozo y col (198) se dedujo que este casi 40% de estructura periódica en hélice alfa, parece estar localizado en ambos extremos de la cadena polipeptídica, mientras que las conformaciones β y ordenación aperiódica, se encuentran situadas en la parte central de la molécula.

La proteína retiene su conformación nativa por encima de los 75°C y hasta los 95°C, temperatura a la cual se induce la desnaturalización de la molécula, según puede deducirse de los espectros de dicroísmo circular (198). Cuando esta muestra de la proteína desnaturalizada, es incubada a 4°C durante 18 horas, se recupera el 90% de la elipticidad a 220 nm correspondiente a la conformación nativa (198).

Estos resultados confirman que la α -sarcina presenta una estructura secundaria muy estable; así mismo, la proteína retiene su actividad ribonucleasa a 75°C (198).

Para obtener información sobre la estructura terciaria de la proteína, Martínez del Pozo y col (198) realizaron el análisis del perfil de hidropaticidad obtenido a partir de su secuencia de aminoácidos, aplicando el método descrito por Kyte y Doolittle (199). De este modo, observaron que la proteína presenta tres regiones hidrofílicas mayoritarias correspondientes con las posiciones 1-6, 95-100 y 120-140. Las tres regiones coinciden con zonas de estructura β -laminar de carácter expuesto, lo que podría significar que estas regiones son núcleos de plegamiento de la

proteína (198).

Los resultados obtenidos sobre la homología de secuencia y de estructura de las aspergilinas corroboraban los datos aportados por Conde y col (200) y recogidos en la figura 1.7., en estudios de antigenicidad de las proteínas con antisueros de conejo específicos contra muestras de cada una de ellas. Así, fue posible observar en experimentos de inmunodifusión radial con un antisuero contra la α -sarcina, que existe reacción parcial entre la α -sarcina y las otras dos proteínas, y reacción total entre la mitogillina y la restrictocina. Sin embargo, no se observó reacción de precipitación de este antisuero con otras toxinas de origen vegetal, como la ricina, la abrina y la PAP (200). Por otro lado, estos mismos autores comprobaron que el anticuerpo de conejo contra α -sarcina era capaz de inhibir la actividad tóxica de la mitogillina y la restrictocina (200).

Recientemente han sido publicados los datos preliminares de la cristalización de la mitogillina, realizada por Martínez y Smith (201), en un sistema de doble cámara de difusión vapor/líquido y utilizando metanol como agente precipitante. El estudio de difracción de rayos X, ha dado como resultado unas dimensiones para los grupos espaciales monocíclicos $P2_1$ de $a=50.4$ Å, $b=38.2$ Å y $\beta=99.8^\circ$. La mitogillina cristalizaría en forma dimérica en unidades asimétricas con un contenido de solvente de aproximadamente el 46% (201).

1.3.5.4.3. Genes que codifican para las aspergilinas

La secuencia del gen de la α -sarcina, ha sido determinada por Oka y col (243), en clones aislados a partir de la expresión en el fago lambda gt11 de una librería génica del cDNA de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, usando anticuerpos específicos contra la α -sarcina.

Así se sabe que la secuencia completa del gen de la toxina, está compuesta por 531 pares de bases que codifican, además de para la α -sarcina, para una secuencia de 27 aminoácidos en el extremo N-terminal, antes de la primera alanina (243); el gen presenta una región en el extremo 3' no expresada, que contiene una larga secuencia de poli A. Por tanto, la proteína estaría compuesta por 177 aminoácidos, 27 de los cuales son eliminados durante el proceso de maduración (243).

Este resultado confirma las observaciones realizadas por Miller y Bodley (214), según las cuales las moléculas de α -sarcina presentes en el lisado del micelio de *A. giganteus* MDH 18894, no son activas sobre los ribosomas del hongo mientras que, cuando se utilizan muestras de proteína aislada a partir del medio de cultivo, los ribosomas de *A. giganteus* y de *A. nidulans* resultan inactivados.

Por tanto, el hongo produciría la proteína de forma inactiva y la segregaría de forma efectiva cotranslacionalmente, protegiendo de estas forma a sus ribosomas de la acción de la toxina (214). Un mecanismo similar ha sido descrito en las bacterias de la especie *Streptomyces aureus* que se protegen de la acción de antibióticos como el tiostrepton (214). Este antibiótico inhibe

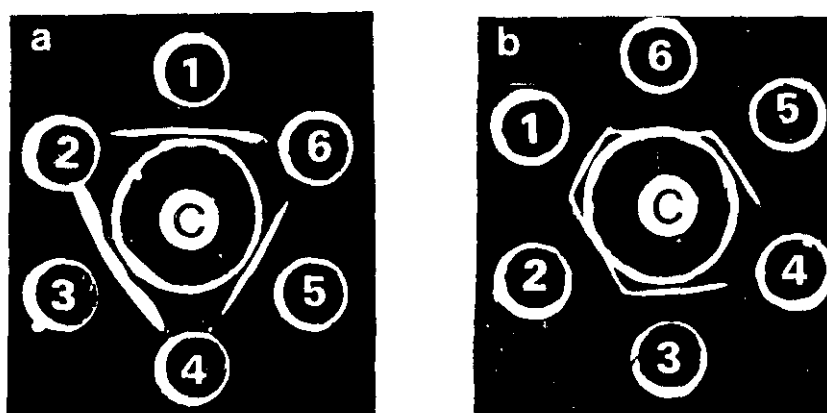


Fig. 1.7. Análisis comparativo de la reacción cruzada entre las aspergilinas y distintas toxinas vegetales

En la figura se recogen los resultados obtenidos en inmunodifusión radial para distintas toxinas frente a un antisuero de conejo específico contra la α -sarcina (pocillos C de a. y b.). En la figura a. puede observarse como el antisuero reconoce específicamente las muestras de α -sarcina (pocillos 1,3 y 5), mientras que no se observa reacción con la PAP (pocillo 2), la ricina (pocillo 4) y la abrina (pocillo 6). Por el contrario, en la figura b) se observa como el antisuero reconoce a la mitogillina (pocillos 2 y 5) y a la restrictocina (pocillos 3 y 6), que presentan reacción cruzada parcial con la α -sarcina (pocillos 1 y 3). Las inmunodifusiones han sido tomadas de Conde y col (200).

la síntesis de proteínas por metilación de las bases específicas implicadas en la unión con el ARNr 23S (214).

El gen de la α -sarcina ha sido clonado en *Escherichia coli*. Para ello, Henze y col (244) sintetizaron químicamente la región de ADN a partir de 19 oligonucleótidos que se solapan de forma ordenada, utilizando el vector de clonaje para secreción pIN-III-OmpA2 y el plásmido pA2T1-108 desarrollado previamente para la expresión de la ribonucleasa RNasa T1 de *A. oryzae*. El clonaje se llevó a cabo en la cepa MV1190 de *E. coli* y la proteína aparecía expresada en el periplasma de las células bacterianas, de las que era extraída por sonicación (244).

Pero la proteína recombinante era capaz de actuar sobre los ribosomas de la bacteria, inhibiendo su fase de crecimiento exponencial. Para explicar este hecho, se postuló la posibilidad de que la α -sarcina, tras su síntesis, procesamiento y excreción al medio, sería capaz de volver a entrar en las células a través de poros formados en la membrana (213).

La determinación de la secuencia del gen de la restrictocina de *Aspergillus restrictus* ATCC 34475, así como su expresión en *A. nidulans*, han sido llevada a cabo recientemente por Lamy y Davies (177). El gen, denominado gen res, posee un corto intrón de 52 pares de bases inmediatamente antes del aminoácido N-terminal.

La expresión en *A. nidulans* del gen res, ha permitido obtener una proteína activa en el medio de cultivo del hongo. En este caso, las células del micelio del hongo no se ven afectadas por la acción de la restrictocina lo sugiere que, al igual que ocurre con la α -sarcina, se sintetiza también en forma de proenzima (177).

Las secuencias de los genes de α -sarcina y restrictocina están registrados en la Base de Datos de Secuencia Génicas del EMBL (European Molecular Biology Laboratories), con los números de acceso X53394, para el gen sintético de la α -sarcina (244) y X56176, para el gen res de la restrictocina (177), mientras que la secuencia del gen de α -sarcina está registrada en el Banco de Datos Japones, con el número de acceso D00576 (243).

Recientemente ha sido clonado el gen del antígeno Aspg-I, de *Aspergillus fumigatus* y expresada la proteína en *Escherichia coli*, comprobándose que presenta un alto grado de homología con la restrictocina (477,478).

1.3.5.5. Actividad

1.3.5.5.1. Inhibición de la síntesis de proteínas

Los primeros datos sobre el modo de acción de la α -sarcina, se deben a Schindler y Davies en 1977 (202), quienes hablan de la α -sarcina como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucarióticas a bajas concentraciones.

Schindler y Davies (202) observaron que, tras el tratamiento de ribosomas de levadura con la proteína aparecía un

fragmento de ARN, de aproximadamente 320 nucleótidos. Estos autores llegaron a la conclusión de que la proteína inducía la rotura específica del ARNr 25S de la subunidad mayor, y apuntaron la posibilidad de que esta rotura se produjese cerca del extremo 3' terminal (203). Por otra parte, y a pesar de que Olson y col (40) no habían encontrado actividad bactericida en esta proteína, observaron que en ribosomas de *Escherichia coli* se obtenían resultados similares aunque era necesaria una concentración de toxina un orden de magnitud mayor (202).

En estudios posteriores (45,200,203) se demostró que la α -sarcina inhibe la síntesis de proteínas en células procarióticas y eucarióticas por inactivación catalítica de la subunidad mayor del ribosoma, previniendo la unión del aminoacil-ARNt al ribosoma catalizada por el factor de elongación FE1. Se comprobó, así mismo, que también la restrictocina y la mitogillina eran capaces de inhibir la elongación de las cadenas polipeptídicas en ribosomas, obteniéndose un resultado similar para las tres proteínas (204).

Aunque Schindler y Davies (202) habían señalado que la α -sarcina no tenía actividad sobre ribosomas de hígado de rata, Endo y Wool (45) demostraron que, en presencia de EDTA o de puromicina-ClK, agentes que promueven la liberación del peptidil-ARNt del sitio P, era capaz de cortar el ARNr 28S de polisomas de hígado de rata. Estos autores sugirieron que el peptidil-ARNt se unía al ribosoma cerca del sitio de acción de la α -sarcina o bien que su unión en otra localización desestructura, de alguna forma, el sitio de acción de la toxina (45).

El análisis de la secuencia de corte de la α -sarcina fue realizado por primera vez en los ribosomas de hígado de rata, en donde se observaba que, tras el tratamiento con la proteína, aparecía un fragmento derivado del extremo 3' terminal del ARNr 28S, con un peso molecular de 161.000 y de aproximadamente 488 bases (45). Este fragmento fue denominado fragmento α (45).

Analizando el resultado obtenido sobre distintos ribosomas, el efecto de la α -sarcina se visualizó, en todos los casos, por la obtención de un fragmento de longitud entre 240 y 500 nucleótidos, según el sustrato utilizado (205). De esta forma, por ejemplo, el fragmento α presentó una longitud de 488 nucleótidos en el ARNr 28S de polisomas de hígado de rata a partir de la base G-4325 (45), de 243 en el ARNr 23S de los ribosomas de *E. coli* a partir de la base G 2661 (45) y de, aproximadamente, 367 bases en el ARNr 25S de los ribosomas de levadura a partir de la base 3392 (206).

La secuenciación de los distintos fragmento α , obtenidos en cada una de las subunidades mayores de ribosomas procarióticos y eucarióticos, permitió demostrar que la posición y la secuencia del sitio de corte de la α -sarcina es correspondiente en los ARNr de todas las especies (205). También fue secuenciado el sitio de corte de la restrictocina y la mitogillina en ribosomas de cerebro de rata por Fando y col (204), resultando ser el mismo que el de α -sarcina.

Esta secuencia de corte está formada por 12 nucleótidos, es rica en purinas y está altamente conservada ya que, según puede

observarse en la figura 1.8., aparece en los ARNr de la subunidad mayor de los ribosomas 70S de procariotas (45) y 80S de eucariotas (45,207) y en los ribosomas de mitocondrias y de cloroplastos (205,208), así como en arqueobacterias (209).

Sólo se han encontrado diferencias de una base entre la secuencia presente en los ribosomas eucarióticos y procarióticos, lo que podría explicar la distinta sensibilidad de estos ribosomas a la toxina (209). Sin embargo, según demuestran Sanz y Amils (209), la mitogillina y la restrictocina no son efectivas sobre los ribosomas de *Sulfolobus solfataricus*.

El sitio de corte fue localizado por Hausner y col (208) en el lazo 83 del dominio D del ARNr 23S de *E. coli*, de acuerdo con el mapa realizado por Maly y Brimacombe (210) (ver figura 1.10. A). Mientras que Leffers y col (211) lo ubican en el ápice de la hélice 2 del dominio VIA del ARNr definido por Garret y col (212).

Ackerman y col (213) demostraron por microinyección de la α -sarcina en oocitos de *Xenopus laevis* que la proteína es capaz de reconocer esta secuencia cerca del extremo 3' terminal del ARNr 28S, rompiendo la guanina 3733 y dando origen a un fragmento α de 377 nucleótidos.

Miller y Bodley (214), aseguran que la α -sarcina es capaz de reconocer el sitio de corte en el ARNr de *E. coli* y *Sacharomyces cerevisiae* en ausencia de proteínas y aún cuando el ARN presente alguno de sus enlaces fosfodiéster hidrolizado. El porcentaje de digestión, en tal caso, es de aproximadamente el doble sobre el ARNr sin proteínas que en presencia de las mismas (214).

1.3.5.5.2. Otras actividades ribonucleásicas

La α -sarcina ha presentado actividad endonucleasa sobre distintos sustratos como actividad independiente de su capacidad para inhibir la síntesis proteica (205,208).

Endo y col (205) y Hausner y col (208) atribuyen a la proteína una actividad endonucleasa específica de purinas en ARNr desprovisto de proteínas.

Por otro lado, Endo y col (205) describen también como la α -sarcina es capaz de hidrolizar muestras de ARNr 23S que presentan algún enlace fosfodiéster roto de *E. coli*, sin embargo, la especificidad de la rotura no es total, ya que tras la digestión aparecen dos bandas predominantes. Una de estas bandas corresponde con el fragmento α , y la otra, denominada fragmento α_1 , contiene el extremo 5' del ARNr 23S y tiene aproximadamente 400 nucleótidos de longitud (205). Sin embargo, Hausner y col, (208) no son capaces de reproducir estos datos debido, según ellos, al distinto grado de pureza de las muestras de ARNr 23S utilizadas.

También ha sido determinada la especificidad de la α -sarcina sobre los nucleótidos, utilizando homopolímeros sintéticos. De esta manera, se comprobó que la α -sarcina digiere los ácidos

poliadenílico y poliinosínico principalmente, en menor medida el ácido poliguanílico y no presenta actividad sobre los ácidos policitidílico y poliuridílico (205).

1.3.5.5.3. Importancia del dominio α -sarcina/ricina del ARNr.

Hausner y col (208) apuntaron que la especificidad de la acción de la α -sarcina sobre un lazo del ARNr, debía de depender tanto de la secuencia de bases como de la estructura que este lazo presentaba.

Endo y col (215) defienden que esta especificidad de la α -sarcina sobre los ribosomas está también en función del dominio del ARNr donde se incluye dicho lazo. Para confirmar este hecho, utilizaron oligonucleótidos sintéticos, formados por 35 nucleótidos y denominados 35-mer, que reproducían la secuencia del lazo donde se incluye el sitio de corte de la α -sarcina y el pie o vástago que une el lazo al ARNr 28S de la subunidad 60S de los ribosomas eucarióticos. La estructura de este nucleótido sintético y los sitios de actuación de la α -sarcina y de la ricina, quedan recogidos en la figura 1.9. donde también se recoge el sitio de corte del ARNr 23S de *Escherichia coli* (222).

Los oligonucleótidos 35-mer eran reconocidos e hidrolizados de forma específica por la proteína a concentraciones similares a las utilizadas en ribosomas completos; mientras que esta no era capaz de reconocer ni de hidrolizar los oligonucleótidos denominados 20-mer con solo 20 nucleótidos, que se corresponden con la secuencia del lazo, pero no incluyen el pie o vástago del dominio (215).

La secuencia completa de este dominio ha sido identificada en el ARNr 28S de *Xenopus laevis* (216). El sitio de corte para la α -sarcina es la G-3733, el lazo comprende entre los nucleótidos U-3724 y C-3740, mientras que el dominio, que incluye el lazo más el vástago o pie de unión, se extiende a C-3719 y G-3744 en el ARNr 28S (216).

Endo y col (217) señalaron que la estructura de este lazo en los ribosomas eucarióticos es igualmente importante para la actividad de la ricina. De esta manera, cuando se cambia en la secuencia de los oligonucleótidos 35-mer la base A-4324 por cualquier otro nucleótido, la proteína pierde su capacidad de actuación.

La hidrólisis de la α -sarcina en la posición correspondiente en los oligonucleótidos sintéticos, previene el reconocimiento de la cadena A de la ricina (217).

1.3.5.5.4. Modificación inducidas en los ribosomas eucarióticos por la α -sarcina. Comparación con la ricina.

La actividad de inhibición de la síntesis de proteínas que prosigue tanto a la actuación de la α -sarcina como a la de la ricina, ha sido relacionada con la desestructuración de los ribosomas (208,218,219).

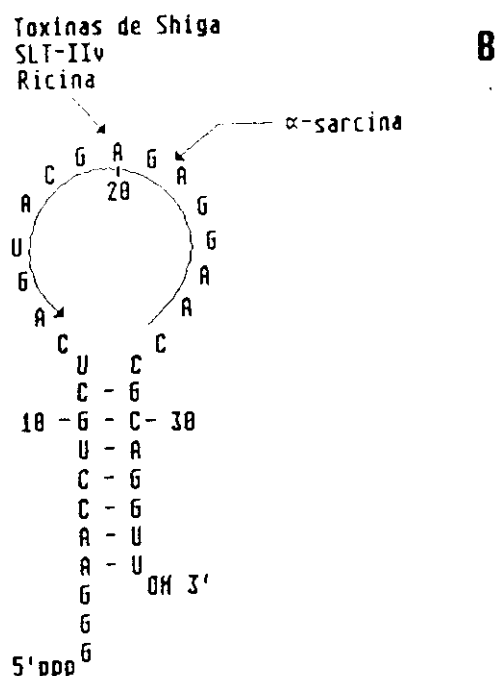
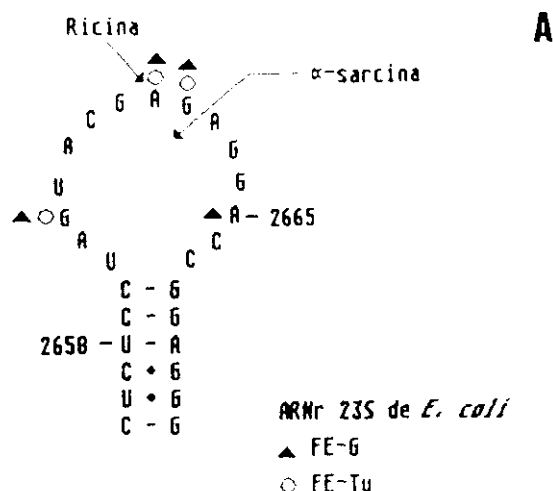


Fig. 1.9. Sitio de acción de la α-sarcina y de otras toxinas con actividad ribonucleasa

A. En la figura se representa la secuencia del lazo del ARNr 23 S de los ribosomas de *Escherichia coli*, en donde llevan a cabo su actividad la α-sarcina y la ricina, indicado con una flecha. Así mismo, se señalan las bases con las que interaccionan los factores de elongación FE-1 y FE-2, implicados en la síntesis de proteínas. El esquema ha sido tomada de Moazed y col (222)

B. Secuencia del nucleótido 35-mer, sintetizado por Endo y col (217) que reproduce la secuencia de corte de las distintas toxinas en el ARNr 28S de la subunidad 60S de los ribosomas eucarióticos (216) y que incluye tanto la secuencia de corte como el pie o vástago que une dicha secuencia con el resto del ARNr. Como puede observarse, también han sido señalados los sitio de corte de la α-sarcina, así como en de la ricina y de las toxinas del género *Shigella* (Shiga y SLT-IIv), que actúan al mismo nivel.

El hecho de que, según Cawley y col (219), altas concentraciones de Mg^{2+} devolvieran parte de la actividad perdida a los ribosomas tratados con ricina y que, según describe Paleologue y col (218), tanto esta toxina como la α -sarcina indujeran cambios en las curvas de desnaturalización de la subunidad 60S, permitió pensar que ambas proteínas modificaban las interacciones entre los ARNr que componen el ribosoma o entre los dominios de ARN y las proteínas ribosomales (218,219).

La inactivación de los ribosomas por la ricina se asoció con la desestabilización de la subunidad 60S ribosómica, demostrada por un incremento térmico en la relajación del complejo L5-ARNr 5S (218), mientras que el efecto de la α -sarcina estaría asociado con una debilitación de la interacción entre los ARNr 28S y 5.8S (220).

Así pudo deducirse por los estudios llevados a cabo por Terao y col (221), en los que se determinaban cuales eran las proteínas ribosomales en las que variaba el porcentaje de incorporación de N-etilmaleimida tras el tratamiento de los ribosomas 80S con las toxinas, que ambas inducen cambios conformacionales en la subunidad 60S de los ribosomas de hígado de rata. Según estos autores (ver figura 1.10. B), las proteínas alteradas eran la proteína L14, tras el tratamiento con ricina y las proteínas L3 y L4, tras el tratamiento con α -sarcina, todas ellas muy próximas en la estructura del ribosoma (221).

L3 y L4, que aparecen unidas entre sí, tienen un importante papel en el proceso de síntesis de proteínas. L4 está localizada en el sitio A y L3 en el sitio P, ambas pueden interaccionar con el FE-2. Estas dos proteínas se unen a su vez con L5, también situada en el sitio P e incluida en el complejo ARNr 5S-proteína de la subunidad 60S de los mamíferos y localizada entre las dos subunidades ribosómicas (221).

Por otro lado, L14 está situada en la subunidad 60S, en la interfase de ambas subunidades (221) y, topológicamente, coincide con el sitio de unión del factor de elongación FE-2. De esta manera, los cambios estructurales inducidos en el ribosoma, serían la causa de la posterior inactivación de la síntesis de proteínas (217).

Desde un primer momento, la actividad de la α -sarcina se relacionó con fenómenos tales como la inhibición de la interacción del factor de elongación 1 dependiente de la unión del aminoacil-ARNt (FE-1 o FE-Tu) (45), la ocupación del sitio A por el aminoacil-ARNt (203) y la inhibición de la unión de los complejos binarios formados entre el factor de elongación 2 (FE-2 o Fe-G) y el GTP con los ribosomas (200).

Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Hausner y col (208), quien especifican que la α -sarcina, rompiendo detrás de la G-2661 en el ARNr 23S de *E. coli*, bloqueaba específicamente la unión de ambos factores de elongación: el complejo ternario Phe-ARNt*FE-Tu-GMPPNP y el complejo FE-G*GMPPNP. Las demás funciones independientes de estos factores tales como la asociación de las subunidades ribosómicas, la unión del ARNt al sitio A y P, la precisión en la elección de ARNt en ambos sitios, la actividad peptidil transferasa y la transloca-

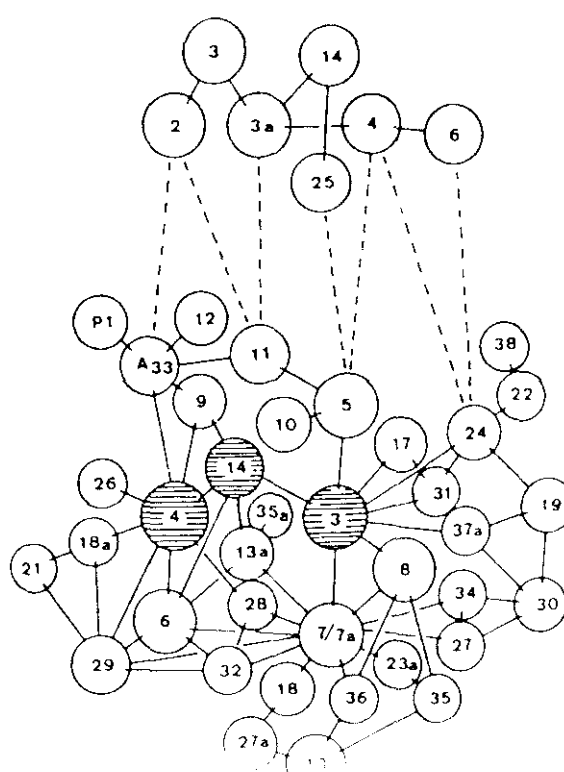
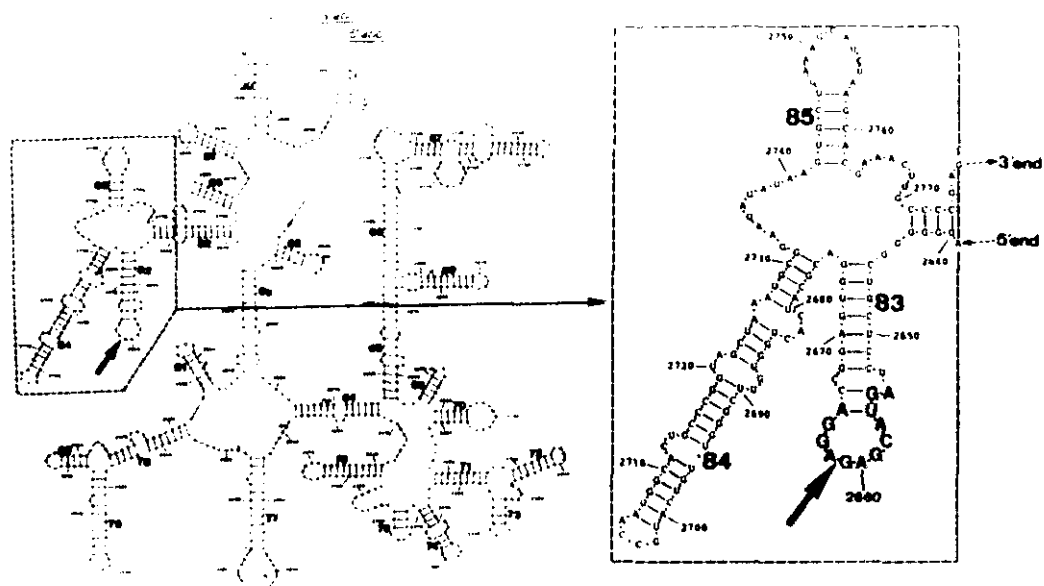


Fig. 1.10. Sitio de acción de las aspergilas y de las toxinas vegetales en el ribosoma

A. En la figura aparece representado el mapa de la estructura secundaria del ARNr 23S de *Escherichia coli*, según recogen Hausner y col (280). Como puede observarse, ha sido ampliado el lazo 83 del dominio D, que incluye la secuencia de corte de la α -sarcina y las bases G-2661 y A-2662 entre las que actúa la proteína.

B. Esquema topográfico de la disposición de las proteínas en los ribosomas 80S de hígado de rata, en el que se indicaban las proteínas que se ven afectadas por la acción de la α -sarcina y de la ricina, según describen Terao y col (221). La localización de las proteínas L3, L4 y L14 aparecen señaladas en el esquema con relleno a modo de barras (ver apartado 1.3.5.4.4.).

ción espontánea independiente de FE-G, no se ven afectadas (208).

Ambos factores de elongación, se unen al lazo del ARNr 23S, en sitios solapados y de forma excluyente, a nivel de las posiciones A-2660,G-2661 (208). En estas posiciones es donde tiene lugar la actividad fosfodiesterasa de la α -sarcina y la actividad N-glicosidasa de la ricina (208,222).

Sin embargo, Brigotti y col (223) especificaron en estudios comparativos realizados en ribosomas de *Artemia salina*, que mientras la α -sarcina inhibe la unión a los ribosomas de ambos factores, la ricina y la volkensina, inhiben sólo la unión del factor FE-2 dependiente de la unión de GTP. La unión de dicho factor a los ribosomas, protege a estos de la acción de la α -sarcina y de la ricina, mientras que el sitio de unión de factor FE-1 se ve sólo afectado por la acción de la α -sarcina, comprobándose que la sensibilidad de este punto a la acción de la proteína aumenta cuando los ribosomas son tratados previamente con la ricina (223).

Según estos autores, los ribosomas quedan protegidos contra la actividad N-glicosidasa de la ricina y toxinas relacionadas cuando se incuban previamente con la α -sarcina (223).

Estos datos han sido confirmados por Miller y Bodley (224), quienes señalan que la unión del FE-G y el GDP a los ribosomas de *E. coli*, inhiben la acción de la α -sarcina, así como que la una unión irreversible del antibiótico tiostrepton, hace que la actividad de la proteína se reduzca a la mitad. Estos mismos autores describen un patrón similar tras la unión del factor de elongación 2 (FE-2) a los ribosomas de *Sacharomyces cerevisiae* (224).

1.3.5.5.5. Actividad antitumoral y entrada en células

Originalmente, las aspergilinas fueron estudiadas como proteínas que presentaban actividad antitumoral (41,42,179). Así, de los 28 tumores inducidos en ratón estudiados por Olson y col (41), 13 resultaron ser inhibidos por α -sarcina a dosis bajas. Por otro lado, la mitogillina sólo resultó activa en sarcoma 180 mientras que se comprobó que era capaz de reducir el tamaño de gran número de tumores de perros, tales como linfosarcomas, adenocarcinomas, carcinomas mamarios y mastocimas malignos (179).

Pero las aspergilinas se han presentado como proteínas que presenta una alta selectividad de entrada en las células (225-234). Según los resultados obtenidos en estudios sobre permeabilización de membranas citoplasmáticas, algunas células como HeLa y BHK que no son sensibles a la acción de la α -sarcina ya que la proteína no es capaz de atravesar sus membranas, ven inhibida de forma irreversible su síntesis de proteínas cuando son tratadas con virus (225) o con ionóforos del tipo de la nigericina (226). Por otro lado, la entrada de la α -sarcina en células infectadas con virus, no es bloqueada por polisacáridos sulfatados como el carragenan, que sí inhibe la replicación vírica tras la internalización (227).

De acuerdo con estos datos, Fernandez-Puentes y Vázquez

(228,229) señalan que las células tratadas con virus o con ionóforos modifican la permeabilidad de sus membranas a macromoléculas de naturaleza hidrofílica, por mecanismos cuya naturaleza está aun sin dilucidar.

La adición de ATP externo en distintas condiciones permite también la entrada de la α -sarcina en las células (230). Para explicar la base molecular de dicha entrada favorecida por ATP, se sugirió la formación de canales acuosos que combinan su efecto con la salida de iones y pequeños metabolitos (203). También fue sugerida la posibilidad de que este hecho podía ser atribuido a mecanismos de fosforilación de distintas proteínas de la membrana celular (230,231).

Por tanto, según apunta Juberías (232), el factor limitante de la actividad de las aspergilinas sería su capacidad de entrada en las células. Aunque la entrada de la α -sarcina fue atribuida, en un principio, a su interacción con receptores específicos presentes en ciertos tipos celulares (40,235), su comportamiento parecía sugerir que la diferente sensibilidad observada estaba en relación con el gran número de residuos cargados positivamente que la proteína tiene y con la presencia en la misma de puentes disulfuro donantes y aceptores, que pueden verse implicados en la interacción con el componente lipídico de la membrana, durante el proceso de entrada (110).

En modelos experimentales desarrollados por Gasset y col (236-239), en los que se estudiaba la interacción de α -sarcina con vesículas de fosfolípidos cargados negativamente como el dimiristoil fosfatidil glicerol (DMFG), se observó la presencia de una fuerte interacción de naturaleza iónica, que podían anteceder a interacciones hidrofóbicas capaz de originar la traslocación de la α -sarcina (236).

Los últimos datos aportados por estos autores, demuestran que esta proteína induce la fusión de las vesículas de DMFG, entre valores de pH 7 y 8, causando una modificación de la permeabilidad de las bicapas lipídicas y de la estructura de los lípidos (237), penetrando en el interior de la bicapa lipídica (238) y alterando su estructura (239). Este proceso de fusión entre membranas es uno de los mecanismos más importantes utilizados en distintos procesos celulares tales como la secreción, la endocitosis y la translocación (237). Se conocen, así mismo, otras proteínas de naturaleza tóxica que inducen la fusión de la bicapa lipídica por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, como por ejemplo la toxina diftérica (240,241) y la toxina tetánica (242).

Lamy y Davies (177), definen a la restrictocina como una toxina de potente actividad catalítica, de manera que una sola molécula libre dentro de la células puede resultar letal, el problema que aún queda por dilucidar es cual es el mecanismo de entrada y cual es la parte de la secuencia de la proteína implicada en dicho mecanismo.

1.3.5.6. Aplicaciones y perspectivas

Las peculiares características que presentan las aspergili-

nas desde el punto de vista de su actividad y de su estructura, han hecho posible su aplicación en diversos campos de la investigación.

Los detallados estudios realizados sobre su modo de acción en los ribosomas de organismos procarióticos y eucarióticos, permitieron elucidar aspectos relacionados con la estructura de los mismos y con los procesos implicados en la síntesis de proteínas (298,214-221).

De esta forma, de su aplicación se han obtenido datos sobre la interacción de los distintos factores de elongación (208), la localización de un fragmento de ARNr muy conservado y que parece fundamental para la funcionalidad de los ribosomas (207) y la localización de algunas de las proteínas ribosomales, en relación con la estructura del ARNr (245-248).

Así, Huber y Wool (245), utilizando la capacidad de la α -sarcina para hidrolizar el enlace 3' de purinas en regiones de ARN por el método denominado "footprinting" o de las huellas, determinaron la asociación de tres de las proteínas ribosomales, L4, L18 y L25, al ARNr 5S de los ribosomas de *E. coli*. Otras proteínas para las que ha sido determinado el sitio de unión con los ácidos nucleicos ribosomales, han sido la proteína U3 humana con el ARNr 28S, implicada en la maduración del mismo (246) y las proteínas que forman las partículas de reconocimiento de señal (SRP), implicadas en los procesos de secreción de proteínas a través de las membranas del retículo endoplasmático (247).

También la α -sarcina fue utilizada en la digestión de los complejos fMet-ARNt, ya que es capaz de digerir distintas posiciones de ARNt, siempre a nivel de purinas, provocando cambios conformacionales en la estructura del ácido ribonucleico (249).

La presencia de la secuencia de corte de la α -sarcina en especies de toda la escala evolutiva, permite preveer que estas proteínas puedan ser utilizadas en estudios filogenéticos relacionados con los ribosomas (45,209).

Las aspergilinas son una valiosa herramienta en estudios de funcionalidad de las membranas celulares (228-239). La α -sarcina ha sido utilizada como control de la permeabilización de membranas celulares durante infecciones virales o en presencia de ionóforos (225,228). El hecho de que, según apuntan Fernandez-Puentes y Carrasco (228) las proteínas penetran más fácilmente en células infectadas por virus y que ha sido considerado por Carrasco (250) como fenómeno de permeabilización temprana provocada por virus animales, hace preveer que su citotoxicidad aumente en estas situaciones y que puedan ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas originadas por virus (228,231).

Por otro lado, permiten llevar a cabo estudios acerca de los fenómenos de permeabilización temprana que se desarrollan en este tipo de enfermedades. Así, según demuestran Castanys y col (234), la α -sarcina es capaz de reducir el número de protozoos parásitos del género *Trypanosoma cruzi*, dentro de las células Hela.

Lamy y Davies (177) señalan que las secuencias líderes de los genes que codifican para las aspergilinas, podrían ser utilizadas en el desarrollo de sistemas de secreción heterólogos en distintas especies de *Aspergillus* y otros hongos filamentosos. Estos mismos autores proponen la aplicación de estos genes a las nuevas tecnologías de genética molecular, tales como la construcción de unidades suicidas bajo el control de reguladores promotores en el tratamiento de distintas enfermedades (251).

La importancia del antígeno Asgf-I, aislado a partir del extracto del micelio de *A. fumigatus* así como de otros antígenos de alto peso molecular presentes en dicho extracto, han sido relacionados con la puesta a punto de procedimientos diagnósticos útiles en la determinación de las especies de *Aspergillus* implicadas en procesos infecciosos que afectan al hombre, como el aspergiloma pulmonar y la aspergilosis invasiva (170,171).

La posibilidad de utilizar las aspergilinas como agentes terapéuticos, ha acompañado siempre a la historia de estas proteínas. Fueron purificadas por su actividad en gran número de células tumorales (40-42,180) y aplicadas en el tratamiento de tumores en animales (180).

Como se intenta demostrar a lo largo de esta tesis, algunas de sus características hacen de estas toxinas moléculas idóneas para la síntesis de inmunoconjugados dirigidos contra tumores humanos de distinta naturaleza (187-189,252).

Hasta el momento, las aspergilinas han sido utilizadas en la síntesis de inmunotoxinas dirigidos contra células de tumores sólidos humanos, pero se prevee en un futuro próximo que puedan ser aplicadas a tumores de origen linfoide tales como distintos tipos de leucemias agudas de origen linfoide desarrolladas en niños (253) o en tratamiento de inmunodeficiencias humanas inducidas por virus (254).

Los estudios realizados en estos años han sido hechos con las toxinas originales producidas por el grupo del Dr. Olson y el "Biologic Products Program" del Estado de Michigan, quienes suministraron proteína a los distintos grupos (40-42). Hasta el momento, no se han requerido cantidades muy grandes de material pero, la posibilidad de utilizarlas como parte de inmunoconjugados, planteaba la urgente necesidad de producirlas en cantidad suficiente para los experimentos "in vivo".

Las cepas de las que se aislaron las proteínas, fueron cedidas a la ATCC (American Type Culture Collection), sin embargo, la cepa original de *Aspergillus restrictus* que producía la restrictocina, fue identificada por el jefe del Departamento de Micología del NIH (National Institut of Health) como *A. fumigatus*, por lo que se considera perdida.

La cepa original que producía la mitogillina no parece estar disponible en ningún laboratorio ni en ninguna colección internacional, y por tanto, la única proteína original que es posible producir de la familia de las aspergilinas es la α -sarcina. Una muestra de la cepa de *A. giganteus* MDH 18894 fue amablemente cedida a nuestro laboratorio, por el Dr. Ulbrich del "Institut für Biochemie" de la Universidad Libre de Berlín, Alemania.

1.3.5.7. Comparación de las aspergilinas con otras enzimas de actividad ribonucleasa

Los primeros estudios comparativos entre la secuencia y la actividad de la α -sarcina con otras enzimas ribonucleasas fueron realizados por Endo y Wool, en 1982 (45).

Estos autores demostraron que la α -sarcina presentaba, sobre los polisomas de hígado de rata, una actividad ribonucleasa específica que otras ribonucleasas como la RNasa T1 de *Aspergillus oryzae*, la RNasa U2 de *Ustilago sphaerogena* o la RNasa pancreática bovina no tenían (45). Mientras que el tratamiento con cantidades creciente de estas ribonucleasas producía una extensa digestión del ARNr, el tratamiento con α -sarcina daba lugar a un único fragmento, resultado del reconocimiento de una única base entre las aproximadamente 7000 bases que constituyen el ARNr 28S (45).

Las mayores homologías de secuencia encontradas entre las aspergilinas y otras ribonucleasas han sido obtenidas con proteínas aisladas a partir de distintas especies de bacterias y de hongos (255-260). Estas ribonucleasas de origen microbiano, constituyen un grupo de proteínas de peso molecular comprendido entre 9.500 y 12.000 y presentan, en la mayoría de los casos, una actividad específica de purinas (255,256).

Las ribonucleasas fúngicas y microbianas, presentan un gran porcentaje de homología de secuencia entre ellas, llegando a valor próximos al 50%. Así, la RNasa U1 de *Ustilago sphaerogena* tiene una homología del 48% con la RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y del 38% con la RNasa U2 de *Ustilago sphaerogena* (257). La proteína más estudiada del este grupo ha sido la RNasa T1, en la que han sido determinados los aminoácidos que constituyen el centro activo (258). El lugar que ocupan estos aminoácidos y el carácter hidropático de la región en la que se encuentran, resultó similar para las demás ribonucleasas (256).

El mayor porcentaje de homología entre estas proteínas y las aspergilinas fue encontrado con la RNasa U2, proteína de 107 aminoácidos (193,194). De esta forma, el número de aminoácidos idénticos entre la RNasa U2 y las aspergilinas es de 36 para la α -sarcina (194), 37 para la restrictocina y 38 para la mitogillina (193), lo que supone un 34.0 %, un 34.9% y un 35.8% de homología respectivamente. Según Martínez y Smith (201), la mitogillina y la RNasa T1 presentan una homología del 24%, sobre los 102 aminoácidos de ambas secuencias que pueden ser comparados. Las regiones en las que el grado de homología es más elevado, se encuentran próximas a los aminoácidos del centro activo de la RNasa T1 (201).

Basandose en la homología de secuencia entre la α -sarcina y la RNasa U2, Martínez del Pozo y col (198) propusieron que los aminoácidos implicados en el centro activo de la α -sarcina, pueden ser los siguientes: His-50, Glu-96-Phe-97-Pro-98, Arg-121 e His-137. Todos estos residuos, excepto la His-50, se encuentran situados en zonas internas de la proteína; las zonas expuestas de la proteína, que estarían cargadas positivamente, serán las responsables de la entrada en la células (198).

Algunas de las ribonucleasas fúngicas y bacterianas han sido utilizada en el desarrollo de la tecnología de resonancia magnética nuclear aplicada a proteínas, por lo que hoy en día se conoce su estructura tridimensional (262-263).

Recientemente, Prior y col (264), han construido una toxina quimérica que contiene los dominios I y II de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) y una molécula de barnasa, ribonucleasa de *Bacillus amyloliquefaciens* de 110 aminoácidos que presenta actividad ribonucleasa específica de guanina (255).

Esta proteína híbrida o quimera mantiene la capacidad para interaccionar con receptores específicos de la membrana celular y para internalizarse dentro de la célula que le confieren los dominio de la exotoxina A, pero presenta una actividad ribonucleasa propia de la barnasa (264).

1.4. Anticuerpos monoclonales utilizados en cancerología

1.4.1. Obtención de anticuerpos monoclonales contra tumores

La tecnología de producción de anticuerpos monoclonales (AcMos), desarrollada por Köhler y Milstein en 1975 (23), permite la selección y la expansión clonal de una única célula híbrida o hibridoma, capaz de producir un único tipo de anticuerpos que reconocen un solo epítipo o determinante antigénico (23). Esta posibilidad tecnológica hizo que los AcMos fueron incorporados inmediatamente a la cancerología (265-271).

Los tumores humanos se caracterizan por la baja inmunogenicidad que inducen en aquellos individuos que los desarrollan, sin embargo, cuando son utilizados como inmunógenos en ratones o en ratas (13), provocan en los animales una respuesta inmune que permite obtener, a partir del bazo de ratón, linfocitos B que sintetizaban anticuerpos contra las células tumorales y que serán susceptibles de ser fusionados con células de linfomas de ratón (23).

Los protocolos de inmunización utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales han sido muy variados. En una primera época, estos anticuerpos eran obtenidos por inmunización con extractos del tejido tumoral, digerido con colagenasa y sometido a tratamiento de disrupción por presión mecánica, y a centrifugación diferencial (272), o a partir del extracto de las membranas de las células tumorales en cultivo, tratadas con agentes que provocan la lisis de sus membranas, como el glicerol (273). Posteriormente, se recurrió a utilizar anticuerpos monoclonales de reactividad conocida para la selección de aquellas células del tumor que expresaban distintos antígenos o la utilización de moléculas purificadas, como los receptores de factores de crecimiento, receptores de interleucinas o proteínas derivadas de oncogenes (9).

1.4.2. Anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a tumores

Los primeros anticuerpos monoclonales obtenidos, que recono-

cian de forma específica a las células tumorales, llevaron a Old en 1981 (11) a definir el concepto de antígenos asociados a tumores como aquellas moléculas expresadas de forma mayoritaria en la superficie de las células tumorales y ausentes, o expresadas en menor proporción, en las células normales.

Hoy en día, ha sido determinada la estructura molecular de gran parte de estos antígenos. Muchos de ellos se identifican como hidratos de carbono que forman parte de mucinas, glicolípidos y glicoproteínas de alto peso molecular de la membrana celular (274,275). Según apuntan Miotti y col (276), estos antígenos, expresados en carcinomas de mama, resultan altamente inmunogénicos en ratón.

Algunos de estos han sido relacionados con moléculas de los grupos sanguíneos ABH, Lewis, Le^a y Le^x, cuya expresión se encuentra alterada en tumores de distintos orígenes (265,276,277). Otras glicoproteínas descritas como antígenos tumor asociados han sido el antígeno carcino- embrionario (CEA), de 200.000 de peso molecular, asociada a los carcinomas de colon, gastrointestinales, mama y pulmón (278,280), la α -fetoproteína, asociada a carcinoma de hígado y de testículo, de 70.000 de peso molecular (279,280), el antígeno específico de próstata, de 34.000 de peso molecular y asociado a carcinomas de dicho órgano (280) o una proteína de 67.000 de peso molecular expresada en los linfocitos humanos, que es reconocida por el anticuerpo monoclonal T101 (281).

A parte de los antígenos asociados a tumores, se han obtenido anticuerpos monoclonales contra un gran número de moléculas que actúan como receptores de distintos ligandos con actividad biológica conocida y que se expresan en la superficie celular. De esta forma, se emplean AcMos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (9,10), contra el receptor de la transferrina (33), el receptor de la interleucina 2 (TAC-IL2) (282), contra antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)(264) y contra moléculas de adhesión como LFA 1 (283).

Algunos de estos receptores presentan una expresión muy elevada en la superficie de la célula cancerígena con respecto a las células normales. Este es el caso del EGFr en distintos carcinomas de origen epitelial (284), o el receptor de la IL-2, en determinadas leucemias T de adultos (285).

Las proteínas expresadas por los miembros de distintas familias de oncogenes, son también utilizadas en la síntesis de anticuerpos contra tumores (9). De esta manera, los AcMos sintetizados contra estas proteínas, han permitido estudiar algunos de los mecanismos de patogénesis del cáncer, lo que hace que los oncogenes sean considerados como uno de los factores de la transformación de las células neoplásicas (286).

La similitud estructural entre estas proteínas expresadas por distintos oncogenes y los receptores para factores de crecimiento, ha llevado a la conclusión de que los genes que expresan para dichos receptores pueden ser considerados como protooncogenes (286). Este es el caso de la proteína erbB2, procedente del oncogen viral c-erbB-2 y el EGFr (287). Ambas

proteínas presentan una expresión elevada en la superficie de las células tumorales lo que ha permitido, según describe Gusterson (288), identificar subgrupos clínicos en tumores que responden de forma diferencial a distintos tipos de terapia, utilizando AcMos contra ellas, de manera que esta es una de la forma de terapia más interesante.

1.4.3. Características de los anticuerpos monoclonales

1.4.3.1. Características relacionadas con el tumor

La determinación de la constante de afinidad del AcMo por el antígeno, es uno de los parámetros más importantes que han de ser tenidos en cuenta para su utilización *in vivo* e *in vitro*. Así, según apuntan Menard y col (289), aquellos anticuerpos que unen a su antígeno con constantes inferiores a 10^{-8} M^{-1} son poco aconsejables para su utilización en inmunoterapia. La determinación de la constante de afinidad y del número de moléculas de receptor presentes en la superficie celular, se realiza normalmente utilizando el método de Scatchard, aplicado a antígenos de membrana y realizado en experimentos en fase sólida (289,290).

La eficacia de los AcMos está en función, no sólo de la constante de afinidad y del número de moléculas de antígeno por células, sino de la regulación a que está sometida la expresión de dichos antígenos (14,291). Muchos de ellos, aparecen expresados en distintos oncotipos; así anticuerpos monoclonales que reconocen carcinomas mamarios, reconocen también muestras de carcinomas de pulmón o de ovario y, en algunas ocasiones, tejido normal (14).

Heppner y col (291) describen como en un mismo tumor coexisten distintas subpoblaciones de células tumorales. Estas células son antigénicamente diferentes y tienen distinta capacidad invasiva y metastatizante. Las células de las metástasis originadas, no siempre expresan los mismos antígenos que las células del tumor primario y, con muy pocas excepciones, un único anticuerpo reconoce un porcentaje elevado de las células tumorales. Para finalizar, el número de moléculas de antígeno está sometido a fluctuaciones a lo largo del ciclo celular (14).

Por todos estos motivos, en muchos casos se ha recurrido a la utilización de varios anticuerpos monoclonales en el tratamiento de determinado tipo de tumores, elegidos por presentar especificidades y reactividades complementarias (13,292).

Los complejos antígeno-anticuerpo formados en la superficie, son internalizados por la células por distintos mecanismos de endocitosis (293). Pero no todos los anticuerpos monoclonales son capaces de inducir la internalización de los complejos formados, de manera que este hecho limita la capacidad terapéutica de los anticuerpos y de las moléculas de ellos derivadas (293,294).

Por último, la vascularización de los tumores sólidos es otro de los inconvenientes encontrados en la aplicación de los AcMos (295). Según describe Cobb (296), los carcinomas presentan un buen aporte de sangre en las primeras etapas de su crecimiento, por lo que los anticuerpos acceden libremente a toda la

superficie del tumor, pero el crecimiento progresivo de las células tumorales provoca la formación de "nidos" o senos sanguíneos dentro del tumor. Cuando la masa del tumor se expande, aumenta la presión intratumoral y el movimiento de las macromoléculas a través de los vasos sanguíneos se reduce, de manera que, estas moléculas se acumulan en el interior de los senos sanguíneos sin que puedan distribuirse a lo largo de todo el tumor (296,297).

1.4.3.2. Características relacionadas con el anticuerpo

La utilización de los anticuerpos monoclonales *in vivo* está condicionada también a aspectos tales como la clase de inmunoglobulinas a la que pertenece, la vía de administración o la respuesta inmune que inducen en humanos inmunoglobulinas de origen murino.

Han sido utilizados anticuerpos monoclonales tanto de clase IgM como IgG (188,265,266,293). Para que estas moléculas sean capaces de llevar a cabo su función, deben tener una distribución adecuada en el organismo, de manera que es necesario llevar a cabo un proceso de selección previo de la inmunoglobulina utilizada (298).

La biodistribución inadecuada de los anticuerpos monoclonales ha sido atribuida en parte a la unión de los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas a receptores expresado en células de distintos órganos como el hígado y el bazo (298). Este hecho puede ser solventado, en parte, utilizando aquellas inmunoglobulinas para las que no se conocen receptores para el Fc en las células humanas, como es el caso del isotipo IgG₄ (299), o con la eliminación química o genética de dicho fragmento, utilizando sólo los fragmentos F(ab') o F(ab')₂ (295).

Los primeros ensayos clínicos realizados con AcMos en humanos permitieron observar que, por sí solos, eran capaces de inhibir el crecimiento del tumor, debido a que provocaban la activación de la respuesta inmune celular y la activación del sistema de complemento, ya que el fragmento Fc presentaba sitios de unión para estas moléculas (300).

En estos procesos también resulta decisivo el isotipo a que pertenecía la inmunoglobulina (14,298). En concreto, las moléculas de IgG2a actuaban a través de macrófagos, implicando en la respuesta inmune al sistema de regulación idiotipo/anti-idiotipo (301). Dyers y col (299) describen, en experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, como los isotipos más eficientes para la activación del complemento y de los sistemas de lisis mediados por células son los isotipos humanos IgG1 e IgG3 y el isotipo de rata IgG2b, de manera que, han sido considerados los isotipos adecuados para la utilización de anticuerpos no conjugados en terapia. La eliminación de los fragmentos Fc, hace que este tipo de reacciones no tenga lugar (300).

Los AcMos inoculados en pacientes provocan, además, una fuerte respuesta inmune de tipo humoral, con la formación de anticuerpos dirigidos mayoritariamente contra la parte constante de la inmunoglobulina murina (302,303). Estos anticuerpos se

conocen como respuesta HAMA (humano contra anticuerpo de ratón). En pacientes inmunocompetentes, la respuesta inmune se desarrolla normalmente a los 15 días de la primera inmunización, lo que dificulta la continuación del tratamiento (304).

Por otro lado, también puede observarse la aparición de una respuesta anti-idiotipo en los pacientes, que puede contribuir a un efecto terapéutico que interfiere con los efectos esperados y que provoca graves fenómenos de hipersensibilidad (301).

Para evitar o reducir el desarrollo de esta respuesta anticorpal, se han utilizado agentes inmunosupresores que eran aplicados antes o durante el tratamiento con AcMos, pero estos tratamientos combinados resultaron poco eficaces (305).

La mejor solución a este problema, teóricamente, era la utilización de AcMos humanos pero, hasta el momento, estos anticuerpos presentan gran número de limitaciones, como son la baja estabilidad de los hibridomas o que la mayoría de los anticuerpos obtenidos son de tipo IgM (299).

La aplicación de la ingeniería genética ha permitido obtener una alternativa válida a los AcMo humanos. De esta manera ha sido posible sintetizar moléculas de inmunoglobulinas que presentan una región Fc humana y una región Fab murina (306).

Orlandi y col (307) describen la expresión en *Escherichia coli*, de un anticuerpo monoclonal híbrido, obtenido a partir del clonaje de las regiones variables de MBrl, utilizando la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. De esta manera, obtuvieron, a partir de un anticuerpo monoclonal murino de clase IgM, un anticuerpo con la región constante humana y la región variable murina y de clase IgG (307).

Esta nueva tecnología ha permitido, no sólo sustituir las regiones constantes de la inmunoglobulina murina por regiones humanas, sino cambiar solamente las regiones CD de una inmunoglobulina humana por las correspondientes regiones murina (306), obtener fragmentos Fv, que posteriormente son conjugados con toxinas (308), o la producción de inmunoglobulinas compuestas por una sola cadena (309). Según Winter y Milstein (310) la ingeniería genética permitirá obtener un repertorio de genes variables de inmunoglobulinas que hará que no sea necesario inmunizar animales para obtener anticuerpos monoclonales (311).

1.4.4. Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales contra tumores

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra tumores han presentado gran número de aplicaciones. En primer lugar, permiten diferenciar entre las células normales y las células neoplásicas en distintos tipos de tumores. Bartek y col (312) analizaron los distintos fenotipos de las células malignas que aparecían en el cáncer de mama.

También son utilizados en el análisis de los procesos de tumorigénesis y en la clarificación de los fenómenos multisistémicos que dan origen a la progresión de tumores. En gran número

de experimentos se ha evidenciado que los tumores presentan distintas propiedades fenotípicas en los carcinomas primarios y en las metástasis (291).

Colnaghi y col (14), en estudios realizados con 4 anticuerpos monoclonales que reconocían distintos epítomos de antígenos expresado en carcinomas infiltrantes ductales, fueron capaces de identificar hasta 10 fenotipos distintos. Horan y col (313) demuestran la modulación de distintos antígenos en cáncer de mama y Cote y col (314), identifican células con capacidad para producir metástasis.

Como ha sido referido ya, han permitido reconocer productos de oncogenes específicos. Cattoretti y col (314) analizaron doscientas muestras de carcinomas mamarios primarios usando anticuerpos contra la proteína del oncogen p53, proteína asociada con la actividad de nucleasas involucradas en el progreso del ciclo celular. La expresión del oncogen p53, fue relacionada con una expresión negativa del receptor de estrógenos y una expresión positiva del EGFr, y permitió evaluar un nuevo parámetro en el diagnóstico del cancer de mama (314).

Así mismo Horan Hand y col (315) utilizando AcMos contra la proteína p21 ras producida por el oncogen ras, descubrieron que la proteína se encontraba en el 50% de los carcinomas primarios, mientras que no aparece en las metástasis.

Por otro lado, han permitido definir la estructura de gran número de oligosacáridos de la superficie celular de los tumores (316,317). Estas moléculas actúan como receptores en funciones de estimulación mitogénica de las células, y funcionan en la modulación de ciertos receptores de naturaleza glicoproteica como los receptores de los factores de crecimiento (318).

Los anticuerpos monoclonales contra tumores son utilizados en gran número de técnicas de diagnóstico y pronóstico de procesos carcinogénicos. Su utilización en técnicas de inmunohistoquímica, ha permitido un diagnóstico diferencial de la categoría de las muestras de tumores humanos que no podían ser diagnosticados con certeza con métodos histológicos (14). En particular, han permitido definir marcadores asociados al tejido original (319) y la discriminación entre distintos tipos de tumores como los carcinomas anaplásticos y linfomas de alto grado (320) o entre mesotelioma y adenocarcinoma (321).

Aquellos anticuerpos que reconocen receptores para hormonas han supuesto un valioso método en técnicas de inmunoensayo (14).

Por otro lado, los antisueros convencionales han sido sustituidos por AcMos en inmunoensayos para la detección de los posibles antígenos asociados a tumores en el suero de pacientes asintomáticos, lo que ha permitido eliminar las desventajas de la variabilidad observada con los antisueros policlonales, debido al aumento de la especificidad y sensibilidad con este ensayo. Así, por ejemplo, se usa el anticuerpo OC125, que muestra la posibilidad de monitorizar los tumores ováricos, y el anticuerpo 19-9, que permite la detección de los adenocarcinomas del tracto gastrointestinal bajo (14). Desafortunadamente, no han resultado útiles en el diagnóstico de marcadores asociados a

carcinomas de mama, ya que éstos sólo se detectan en el suero de pacientes con enfermedad muy avanzada(14).

Pero el mayor interés de los AcMos ha sido su utilización en la terapia contra distintos tipos de tumores, debido a la alta especificidad que presentan por las células tumorales. Como ha sido comentado anteriormente, los AcMos fueron utilizados en un principio por su capacidad para inhibir el crecimiento de determinado tipo de tumores, debido a que eran capaces de inducir una respuesta inmune celular y una activación de complemento (15).

Una de las técnicas más interesantes utilizadas en terapia, ha sido la producción de anticuerpos biespecíficos (5). Estos anticuerpos están formados a partir de la reasociación de las cadenas de dos inmunoglobulinas diferentes, de manera que, cada uno de los fragmentos Fab' presenta especificidad por un antígeno distinto (5). Los AcMos biespecíficos han sido obtenidos a partir de la reducción de los anticuerpos parentales (253) o por fusión de las células de los dos hibridomas productores (322).

Así, han sido utilizados AcMos biespecíficos dirigidos contra antígenos expresados en la membrana de los linfocitos T citotóxicos y antígenos asociados a tumores (4,323) o que presentan especificidad contra toxinas, como la gelonina, y contra antígenos de células de leucemia aguda linfóide (253). En el primer caso, la unión del AcMo al receptor de los linfocitos, activa la respuesta citotóxica que se desarrolla sobre las células del tumor, en el segundo caso, el anticuerpo monoclonal se utiliza de transportador para la toxina, sin necesidad de recurrir a la unión química de ambas moléculas.

Por último, han sido conjugados con proteínas de naturaleza tóxica (15,324), con radioisótopos emisores de radiaciones β y γ (6) y con drogas capaces de inhibir la división celular, como los derivados de la vinca o distintos agentes quimioterapéuticos (4,10). Este grupo de fármacos se denomina genéricamente con el nombre de inmunoconjugados.

1.5. Reactivos de Unión

1.5.1. Definición

Los reactivos químicos utilizados en la síntesis de las inmunotoxinas han de permitir la obtención de un enlace fuerte entre la toxina y el anticuerpo monoclonal, que no altere la estructura ni la actividad de ninguna de las moléculas implicadas en la unión, que sea un enlace estable y perdurable en el tiempo, y no susceptible a los mecanismos de reducción de los organismos vivos (15).

Así mismo, estos reactivos han de permitir una rotura rápida del enlace entre ambas moléculas en el interior de las células, para que sea posible la relajación de la toxina en el citoplasma y ésta pueda llevar a cabo su función de inhibición de la síntesis de proteínas (324,325).

Los primeros conjugados fueron realizados utilizando compuestos químicos que inducían la agregación de las moléculas de anticuerpo con las moléculas de toxina, así, se emplearon agentes como el di-isotiocianato de tolueno (TDIC) (20) o el glutaraldehído, a una concentración final del 0.04% (19), en la conjugación entre la cadena A de la ricina y anticuerpos monoclonales contra células de linfoma (19).

En 1977, Carlsson y col (326) utilizaron agentes bifuncionales para la conjugación de la ARNasa pancreática y la albúmina sérica bovina (BSA), demostrando que ambas proteínas mantenían sus propiedades nativas tras la conjugación. Estos agentes bifuncionales fueron definidos como moléculas con dos grupos reactivos, capaces de reaccionar con las cadenas laterales de algunos aminoácidos, permitiendo la formación de puentes o uniones intra e intermoleculares (326).

Estos reactivos fueron incorporados rápidamente a la síntesis de inmunotoxinas, ya que, según apuntan Jansen y col (22) permitían llevar a cabo métodos de conjugación que imitaban a la naturaleza, creando un puente disulfuro o un enlace tioeter, al igual que los que existen entre la cadena A y la cadena B de la ricina (15). Por otro lado, las uniones a través de puentes disulfuro, resultaban ser reversibles en presencia de agentes reductores como el 2-β-mercaptoetanol (15,326).

En los últimos años, la aplicación de la ingeniería genética a la síntesis de inmunotoxinas ha permitido la expresión en distintas cepas de *Escherichia coli*, de los genes que codifican para las toxinas completas o para los fragmentos activos de las mismas, unidas a las cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales (32), a hormonas (327) y a interleucinas, como la IL-2 (328) y la IL-6 (36). En estos genes ha sido incluida una región de ADN que codifica para un pequeño número de aminoácidos que actúan como elementos de unión, por lo que los agentes bifuncionales han sido sustituidos por puentes amino (32,36,327,328).

Algunos de los agentes bifuncionales mas utilizados en la síntesis de inmunotoxinas quedan recogidos en la figura 1.11., mientras que en la figura 1.12., se muestran los tipos de enlaces que se establecen entre la molécula de inmunoglobulina y la toxina.

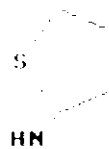
1.5.1.1. Agentes bifuncionales que introducen puentes disulfuro (S-S)

Los agentes bifuncionales más utilizados que introducen puentes S-S, han sido el N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (326) y el 2-iminotiolano hidrocloreuro, (2-IT) (329,330). Un agente similar al SPDP, el N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio)butirato o SPDB, fue sintetizado por Worrell y col (331), aunque los resultados obtenidos con dicho agente no fueron claramente explicados.

La reacción de conjugación a través de SPDP, transcurre en dos etapas: en primer lugar, la estructura 2-piridil disulfuro del SPDP, se introduce en la proteína por reacción de su grupo N-hidroxisuccinimida éster con el grupo NH₂ de la cadena lateral

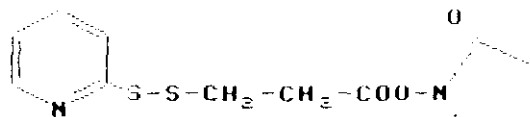
Enlaces S-S

ZIT



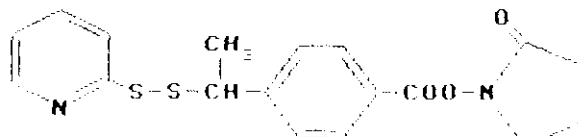
83

SPDP



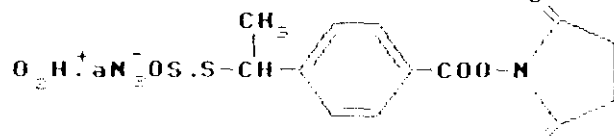
326

SMPT



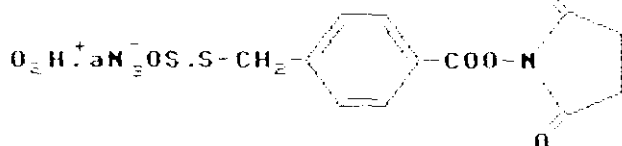
336

SMBT



336

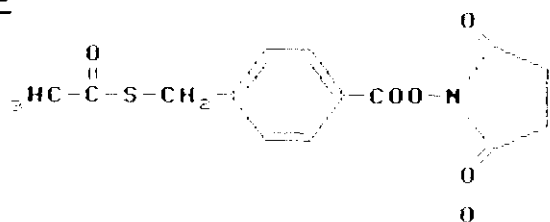
SBT



336

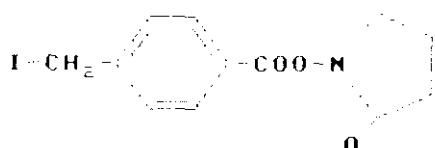
Enlaces C-S

SATA



333

SIA



458

Fig. 1.11. Agentes bifuncionales utilizados en la síntesis de inmunotoxinas

En la figura se recogen algunos de los agentes bifuncionales utilizados en la síntesis de inmunotoxinas, agrupados en función del tipo de enlace que introducen. Los nombres completos se recogen en el texto (ver apartado 1.5.1). Junto a cada uno de ellos, queda indicada la referencia (Ref.) de la que han sido tomados.

de los aminoácidos Lys (K), Arg (R), His (H), Asn (N) o Gln (Q), o con los grupos SH de las Cys libres; posteriormente, los puentes disulfuro introducidos, son fácilmente escindido por reducción o por intercambio con moléculas portadoras de enlaces disulfuro o tiol (326).

En algunas de las toxinas, como es el caso de la cadena A de la ricina o de la abrina, se aprovecha para llevar a cabo la reacción de conjugación, la presencia en la molécula de una Cys libre, de manera que sólo es necesario la reducción de la proteína con 0.1% de 2- β -mercaptoetanol (122,332). Pero la mayoría de las toxinas utilizadas no disponen de grupos SH libres, ya que todas las cisteínas están implicadas en enlaces tioéter (333).

Por esta razón, han sido utilizados distintos métodos para incorporar grupos SH libres a las toxinas. Así, la ricina completa (281,334) se hace reaccionar con m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida (MBS) y, posteriormente con los grupos tiol libres introducidos en la molécula de anticuerpo (281,334) o se recurre a hacer reaccionar la toxina, al igual que el anticuerpo monoclonal, con SPDP, como es el caso de las inmunotoxinas sintetizadas con la saporina (335) o con la α -sarcina (189).

Para elegir el agente de unión más apropiado en cada caso, es necesario determinar los distintos parámetros de reacción (326). De esta forma, es importante tener en cuenta la relación molar entre la proteína y el agente bifuncional, el pH o la fuerza iónica a la que se lleva a cabo dicha reacción (326,333). En cada caso, estos parámetros han de ser determinados previamente, de manera que se utilizan, generalmente, excesos molares de entre 10 y 30 veces en la reacción de los anticuerpos con SPDP (333), mientras que estas proporciones se reducen a valores de entre 3 y 5 veces exceso molar para otros agentes como el SMPT (336).

La longitud del enlace introducido entre ambas moléculas es uno de los puntos considerados más importantes (15). Los enlaces introducidos utilizando moléculas de SPDP tiene una longitud de 4 átomos, por lo que fueron ensayos reactivos de unión que permitían la formación de puentes disulfuro de hasta 11 átomos de longitud, como el ácido 7-azo-8-oxo-10-(-2-piridilditio) deca-noico (15). Estos enlaces resultaban más inestables y no permitían aumentos en la actividad de los immunoconjugados en sistemas celulares, por lo que se consideró que no suponían ninguna ventaja para las moléculas (15).

Los principales problemas derivados de la utilización de enlaces tioéter o S-S en la producción de inmunotoxinas han sido atribuidos a la alta reactividad que presentan los grupos SH introducidos (333). Por un lado, es posible observar *in vivo*, que estos enlaces pueden ser reducidos antes de que las moléculas lleguen a unirse a sus células diana (122); por otro lado, algunos autores defienden que la introducción de este tipo de enlaces inducen la formación de agregados de alto peso molecular entre las moléculas de AcMo, incluso antes de que se lleve a cabo

Agentes de unión	Tipos de enlaces
ZIT	$\text{IgG} \sim \text{NHC}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-S} \sim \text{Toxina}$
SPDP	$\text{IgG} \sim \text{NHCO-CH}_2\text{CH}_2\text{S-S} \sim \text{Toxina}$
SMPT y SMT	$\text{IgG} \sim \text{NHCO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{S-S} \sim \text{Toxina}$
SBT	$\text{IgG} \sim \text{NHCO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{S-S} \sim \text{Toxina}$
SATA*	$\text{IgG} \sim \text{NHCO-CH}_2\text{S-CH}_2\text{-CO} \sim \text{Toxina}$

Fig. 1.12. Tipos de enlaces establecidos entre los anticuerpos monoclonales y las toxinas

En la figura se recogen los distintos tipos de enlaces que se establecen entre los anticuerpos monoclonales y las toxinas, dependiendo de los agentes bifuncionales con que se hace reaccionar la inmunoglobulina. Los agentes ZIT y SPDP permiten obtener puentes disulfuro entre las dos moléculas, mientras que SMPT, SMT y SBT introducen enlaces S-S protegidos, ya que presentan un grupo fenilo en el mismo carbono que soporta el enlace y un fenilo en el caso de SMPT y SMT, según describen Thorpe y col (336). Por último, SATA da origen a un enlace C-S cuando se hace reaccionar con la toxina unida a SIA (458).

la reacción de conjugación (333).

Según Thorpe y col (336), la utilización de agentes bifuncionales como el SMT (sodio S-4-succinimidil-oxi-carbonil- α -metil bencil tiosulfato) y SMPT (4-succinimidil oxycarbonil- α -metil- α (2 piridil ditio) tolueno) evitarían los fenómenos de reducción a que están sometidas las inmunotoxinas. Con estos agentes, un grupo metilo y un anillo bencénico se unen al átomo adyacente al carbono que soporta el puente S-S, protegiendo a dicho enlace del ataque de los grupos tiolato (336).

1.5.1.2. Agentes bifuncionales que introducen enlaces tioéter (C-S)

El segundo grupo de reactivos utilizados como agentes de unión, han sido aquellos que introducen enlaces C-S o tioéter. Los primeros agentes de este grupo utilizados fueron el ácido 6-maleimidocaproico y sus derivados, que proporciona un enlace con una longitud de 9 átomos y las inmunotoxinas sintetizadas con la cadena A de la ricina mantenían tan sólo un 30% de su actividad en sistemas acelulares (15).

Posteriormente, se han utilizado agentes como el N-succinimidil-S-acetiltio acetato (SATA) (333), el sulfo succinimidil 4-(p-maleimidofenil) butirato (SMPB) (337) o el éster m-maleimidibenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) (281) para introducir este tipo de enlaces. Estos agentes, al igual que aquellos que introducen puentes disulfuro, reaccionan con los grupos NH_2 de las cadenas laterales de determinados aminoácidos (333).

Cuando las moléculas de toxinas no presentan grupos SH libres, la conjugación se realiza haciendo reaccionar el AcMo con SATA (338) y posteriormente se une a la toxina previamente iodoacetilada (339).

Según Dosio y col (333), los agentes que introducen enlaces C-S permiten solucionar algunos de los problemas derivados de la utilización de puentes S-S. De esta forma, se evita la formación de agregados de alto peso molecular entre moléculas de AcMo y se previene la unión inespecífica de las inmunotoxinas a la membrana celular; además estos reactivos permiten largos periodos de conservación, debido a que los grupos tioacetilados incorporados a la molécula no son reactivos y los enlaces introducidos pueden considerarse como enlaces inertes.

1.5.2. Problemas derivados de la utilización de ambos tipos de enlaces

Existen gran número de datos contradictorios sobre el comportamiento y la estabilidad de los dos tipos de enlaces introducidos en las inmunotoxinas. Así, los conjugados realizados con enlaces tioéter entre AcMo contra carcinomas mamarios y la cadena A de la ricina, resultaron unas doscientas veces menos tóxicos *in vitro* que los que se llevaron a cabo utilizando un puente disulfuro (340,341), mientras que, inmunotoxinas realizadas entre anticuerpos monoclonales contra igual tipo de tumores y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* presentan una similar

actividad citotóxica (342).

Mashuo y col (341) hablan de la conveniencia de utilizar los puentes disulfuro en las inmunotoxinas realizadas con cadenas A de las toxinas de doble cadena o con las de una sola cadena debido a que, para conseguir la máxima citotoxicidad, estos puentes disulfuro han de ser reducidos dentro de las células por compuestos tales como el glutatión reducido, presente en el interior de las células y que contiene grupos disulfuro reactivos capaces de reducir a otras moléculas.

Esta hipótesis ha sido discutida por numerosos autores, ya que no se ha podido demostrar con claridad que los puentes disulfuro sean accesibles a la rotura *in vivo*. Así, Ramakrishnan y Houston (122) demuestran que inmunotoxinas sintetizadas con la toxina PAP, se mantienen intactas en circulación después de 20 horas tras su inyección por vía intraperitoneal en ratones. Tampoco Bjorn y col (342), han observado diferencias entre el aclaramiento de los conjugados realizados con exotoxina A de *Pseudomonas* unidas a anticuerpos monoclonales a través de puentes disulfuro, con las unidas por puentes tioéter.

Por otro lado, Thorpe y col (336) afirman que, agentes como el SMPT o el SBPT, evitan la reducción observada *in vivo* de los puentes disulfuro. De esta manera, tras 8 horas de inyección, las inmunotoxinas realizadas con la cadena A de la ricina y el anticuerpo monoclonal OX7, que reacciona con Thy 1.1 de ratón, unidas a través de moléculas de SMPT, se mantienen en circulación en un 50% de la dosis inoculada, mientras que, en igual tiempo, sus homólogas realizadas con SPDP se han reducido por completo a los componentes originales (336).

Las causas de la reducción de las inmunotoxinas en plasma no son aún bien conocidas. Distintos autores hablan de que la causa más directa a la que puede atribuirse este proceso de reducción podría ser las moléculas de glutatión reducido (GSH). El GSH, que proporciona la mayor parte de los grupos SH libres presentes en el plasma (330,343), es sintetizado continuamente por el hígado y mantenido a niveles de concentración de 24 μ M (330). La reducción de los conjugados ha sido relacionada también con actividades enzimáticas de tipo reductasas presentes en algunos órganos o tejidos del organismo, como el hígado (343).

Posiblemente, según apuntan Thorpe y col (336), sí que puede considerarse cierta esta hipótesis de que los conjugados son atacados *in vivo*, ligeramente, por las moléculas de GSH; sin embargo, las inmunotoxinas son retiradas de circulación por procesos en los que no aparecen envueltos mecanismos de oxidación de moléculas de oxígeno como cabría de esperar.

1.6. Inmunotoxinas

1.6.1. Introducción

Las primeras inmunotoxinas activas fueron realizadas por Moolten y Cooperband en 1970 (20) entre anticuerpos que reconocían antígenos del virus de las paperas, expresados en la membrana de células del riñón de macaco rhesus, previamente

infectadas con el virus, y moléculas de toxina diftérica.

Las moléculas híbridas resultantes eran capaces de inhibir la síntesis de proteínas en el 60% de las células tratadas, a dosis de 100 µg/ml, mientras que, sólo presentaban un porcentaje de inhibición del 20% en células no infectadas a dosis equivalentes (20).

Unos años más tarde, en 1976, estos mismos autores llevaron a cabo los primeros experimentos en animales, en los que se demostraba que los conjugados realizados con distintos anticuerpos dirigidos contra células tumorales y moléculas de ricina o de toxina diftérica, eran capaces de proteger a los animales del desarrollo del tumor (344).

En esta misma época fueron utilizadas distintas hormonas o lectinas como agentes transportadores de toxinas que, de esta forma, eran dirigidas contra subpoblaciones celulares, y en especial, contra células tumorales (345,346). Pero en todos los casos, los agentes que mostraron una mayor eficacia fueron los anticuerpos capaces de reconocer antígenos de la membrana celular (23).

Una vez iniciado el uso de las inmunotoxinas como terapia, su desarrollo dependía de la disponibilidad de anticuerpos que reconocieran de forma específica los tejidos tumorales (21). La aplicación de las técnicas de cromatografía de afinidad a los antisueros convencionales (347), en un principio y, posteriormente, la utilización de los AcMos (23), permitieron aumentar la eficacia de las moléculas sintetizadas (270).

De esta manera, se consiguió aumentar los factores específicos de las inmunotoxinas y su actividad sobre las líneas celulares diana (348).

Los primeros que utilizaron anticuerpos monoclonales fueron Jansen y col (15), quienes emplean anticuerpos de clase IgM contra el antígeno Thy 1.2 de linfocitos T de ratón; Royston y cols (348) que usan el anticuerpo T101, una IgG2a que reconoce una proteína de 65.000 de peso molecular, presente en linfocitos T maduros e inmaduros humanos; o Brown y col (349), con el anticuerpo 96.5, dirigido contra el antígeno P97 asociado a melanoma, entre otros. Aunque la mayoría de estos anticuerpos monoclonales estaban dirigidos contra antígenos expresados en leucemias de origen linfoide, también fueron utilizados AcMos dirigidos contra tumores sólidos, como los obtenidos por Gilliland y col (268) contra carcinomas de colon.

A lo largo de estos años, la composición de las inmunotoxinas ha sido modificada en función a los problemas surgidos de su aplicación *in vivo*, tanto en animales como en el hombre. De esta forma, se han utilizado distintas toxinas y anticuerpos monoclonales, o se ha recurrido a estrategias como la modificación química de sus componentes o la ingeniería genética, para aumentar la eficacia de las moléculas aplicadas a la terapia de tumores humanos (32,91,136,328,350-353).

1.6.2. Tipos de inmunotoxinas

Las primeras inmunotoxinas fueron sintetizadas utilizando moléculas de toxinas de más de una cadena de origen vegetal y bacteriano, compuestas por dos cadenas o regiones A y B (19,20,22).

Estas moléculas mostraron un alto grado de toxicidad no específica (19,20) que fue atribuida a la unión de las cadenas B de las toxinas a los receptores presentes en células de tejidos distintos al tumor (22), de manera que, enseguida empezaron a utilizarse sólo las cadenas A o los fragmentos correspondientes en los que se localiza la actividad enzimática de la proteína (346).

Así, se prepararon inmunotoxinas con la cadena A de la ricina (22,270,271,332,354), de la abrina (354) y de la toxina diftérica (355,356), o con el dominio A de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (330).

La utilización de las cadenas A de las toxinas, hizo que fuera necesario disponer de material altamente purificado, ya que, pequeñas contaminaciones de cadena B interferían en la actividad de los conjugados (31). Para evitar la tediosa tarea de purificar las cadenas A, se empezaron a utilizar las toxinas del grupo de las RIPs de tipo I, carentes de dominios de unión a las células, pero con características estructurales y con actividades similares a la cadena A de las toxinas vegetales y bacterianas (26,31).

Se han utilizado toxinas como las PAPs de *Phytolacca americana* (122,357,358), la gelonina de *Gelonium multiflorum* (31,359-361), la saporina de *Saponaria officinalis* (253,335), la briodina de *Bryonia dioica* (362), la momordina (359,362) y la momorcochina de *Momordica charantia* (66), el inhibidor de la cebada de *Hordeum vulgare* (363), la tricosantina de *Trichosanthes kirilowii* (364), la lufina II de *Luffa aegyptiaca* (365) o la viscumina de *Viscum album* (366), cuyos conjugados han sido denominados inmunotoxinas de cadena A (31).

Por otro lado, la presencia de hidratos de carbono en la cadena A de las toxinas vegetales, que interaccionan con restos de manosa presentes en las células de distintos órganos, como el hígado o el bazo, hizo que se recurriera a la deglicosilación química de las toxinas (69), de manera que, se ha utilizado frecuentemente la cadena A de la ricina deglicosilada en la síntesis de inmunotoxinas (250,295,330,363,254).

Según apuntan Blatter y col (31), puede ser importante que las inmunotoxinas utilizadas en clínica presenten niveles de citotoxicidad comparables a los que presentan las toxinas nativas, sobre todo cuanto mayor sea el número de pacientes que han de ser tratados. Por este hecho, estos autores consideraron que las toxinas más adecuadas a este tipo de terapia eran las toxinas de doble cadena, que presentan receptores específicos en la célula y mecanismos de toxicidad determinados (31).

En los experimentos que realizaron con la gelonina, se observó que esta toxina, compuesta de una sola cadena y que no

presenta receptores específicos en la membrana celular, es susceptible de sufrir un escape a través de la bicapa lipídica por lo que el número de moléculas necesarias para inhibir la síntesis de proteínas en las células es mucho mayor (31).

Por tanto, fueron utilizadas toxinas con mas de una cadena, en las que la toxicidad no específica derivada de la cadena B, era completamente bloqueada con moléculas de galactosa o lactosa (31,367,368).

El bloqueo de los sitios de unión a galactosa de la cadena B permitió obtener, según Filipovich y col (367), inmunotoxinas eficaces en la purga *ex vivo* de las células T de la médula ósea de pacientes afectados de procesos de leucemia aguda. Wawzynczak y col (368) demuestran, que inmunotoxinas realizadas con la molécula de ricina bloqueada con galactosa y el anticuerpo M-T151, que reconoce el antígeno CD4 en células T linfoblastóides de la línea celular CEM, resultan unas 100 veces más activas que las inmunotoxinas realizadas con la cadena A y el mismo anticuerpo.

Los efectos citotóxicos inespecíficos observados en las inmunotoxinas, no sólo fueron atribuidos a la toxina, ya que estas moléculas eran capaces de actuar en aquellas células que presentaban receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (300). Por esta razón, se empezaron a utilizar los fragmentos Fab' y F(ab')₂ de los AcMos, obtenidos por digestión enzimática, que eran conjugados con las toxinas (295,300,324,335,369).

Así, se han sintetizado inmunotoxinas con los fragmentos Fab' y F(ab')₂ del AcMo J5 y la cadena A de la ricina, contra células CALLA (300), con fragmentos F(ab')₂ del AcMo OX7 y la saporina, contra linfocitos T (335) o con los fragmentos Fab' del AcMo RFB4 y la cadena A de la ricina recombinante, contra células linfoides B (295) entre otros.

En los últimos años, han sido sintetizadas gran número de inmunotoxinas utilizando moléculas de toxina recombinante como la cadena A de la ricina (91,353), la toxina diftérica (35,352) o la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (32,350) e, incluso, se han sintetizado moléculas de inmunotoxinas completas, expresadas en *E. coli* (32,352). El clonaje y la expresión de los genes de las toxinas y de los AcMos, permite modificar la actividad de estas moléculas y aumentar las posibilidades de su aplicación en clínica (352).

El clonaje de la cadena A de la ricina, permitió obtener una proteína libre por completo de restos de azúcares, que presentaba igual actividad que la molécula deglicosilada químicamente (91), y que ha sido utilizada en ensayos clínicos contra carcinomas mamarios (353).

La expresión del gen de la toxina diftérica ha permitido obtener toxinas unas 10.000 veces menos activas que la toxina original, denominadas CRM107, que presenta reducida su capacidad de unión a las células, pero que retiene la capacidad de internalización y su toxicidad como ADP ribosilasa (145). Las inmunotoxinas sintetizadas con estas proteínas mutadas, resultan igualmente tóxicas en las células diana y con menor actividad

inespecífica sobre las células no diana (370).

Por último, a partir del gen que expresa para la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, se han obtenido moléculas completas de inmunotoxinas, por ingeniería genética. Los fragmentos de ADN, expresados en *Escherichia coli*, contiene los genes que codifican para las regiones Fv de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos monoclonales murinos y el fragmento del gen la exotoxina A, que contiene la región que codifica para el dominio activo (32,350,351).

Estos distintos tipos de moléculas híbridas han sido esquematizados en la figura 1.13.

1.6.3. Purificación de las inmunotoxinas

El resultado de la reacción de conjugación entre un AcMo y una toxina es la obtención de las inmunotoxinas junto con las moléculas de AcMo y de toxinas libres (359).

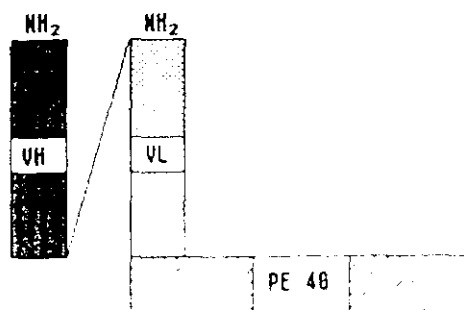
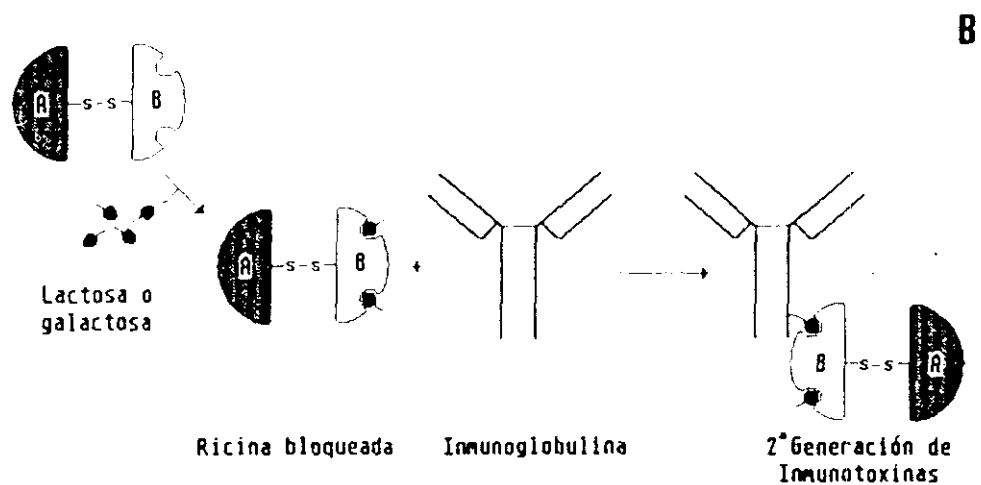
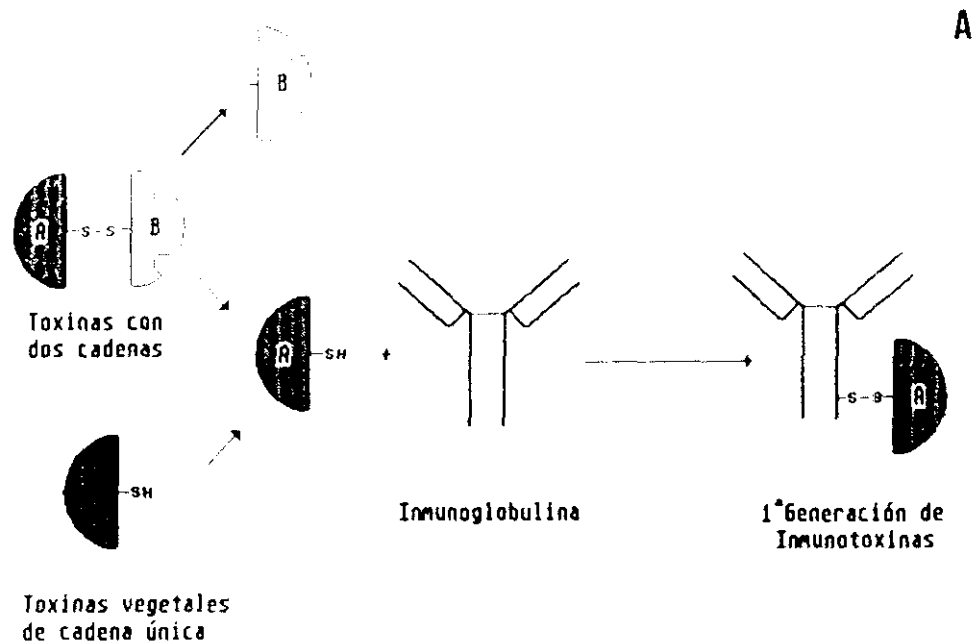
Tras la reacción, la purificación de las inmunotoxinas se lleva a cabo normalmente por cromatografía de filtración en distinto tipo de resinas; así, se han utilizado resinas como Ultragel AcA44 (332), Sephacryl S-200 (122) o Sephacryl S-300 (335), en las que se consigue eliminar la fracción de toxina no conjugada.

Pero, en aquellos casos en los que el rendimiento de conjugación es bajo, el número de moléculas de AcMo libre, presentes en las fracciones eluidas de las columnas de filtración, es muy elevado (359). Esta fracción de AcMo libre reduce considerablemente, *in vitro*, la potencia citotóxica de las inmunotoxinas (371,372), ya que ambas fracciones compiten por la unión a los receptores de la membrana celular (373).

De esta manera, han sido ensayados distintos procedimientos como segundo paso de purificación de las inmunotoxinas, tales como cromatografía de afinidad con IgG específica contra la cadena A de la ricina, unida a Sepharosa 4B (374), distintas resinas de intercambio iónico para los conjugados realizadas con la gelonina y la saporina (375), cromatografía de afinidad en sistema HPLC para la cadena A de la abrina (376) y cromatografía de afinidad en Blue Sepharose CL-6B para los conjugados realizados con la cadena A de la ricina y, nuevamente, la cadena A de la abrina (254,354).

En este último procedimiento se aprovecha la capacidad de interacción de algunas de las toxinas de naturaleza protéica con colorantes triazínicos inmovilizados (187). Esta interacción ha sido comprobada en las cadenas A de la ricina y de la abrina (354), en la toxina diftérica (377), en la gelonina (359,378), en la momordina (359) y en la α -sarcina (378).

Sin embargo, según demuestran Cumber y col (359), mientras que la momordina y la gelonina interaccionan con el Cibacron Blue F3GA, las inmunotoxinas realizadas con ellas, pierden la capacidad de interacción, observándose reducciones de un 35%, en el



3ª Generación de Immunotoxinas

Fig. 1.13. Distintos tipos de inmunotoxinas

En la figura se recogen, a modo de esquema, los distintos tipos de inmunotoxinas que han sido sintetizados. La clasificación en generaciones corresponde a Blättler y col (31), de donde han sido tomados los esquemas A y B. El esquema C se corresponde con la molécula, obtenida por ingeniería genética, que contiene el fragmento del gen de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica para su región activa (PE40) y los genes que codifican para las regiones V_H y V_L del fragmento F_v de un anticuerpo monoclonal anti-TAC, receptor de la IL-2, y está tomado de Chaudhary y col (32).

caso de la gelonina, y de hasta un 75%, en el caso de la momordina. Estos autores sugieren que la unión con el AcMo modifica la capacidad de interacción de las toxinas con el colorante, de manera que, la columna sólo es capaz de retener a aquellas inmunotoxinas que presentan más de una molécula de toxina por molécula de anticuerpo monoclonal.

1.6.4. Actividad de las inmunotoxinas

1.6.4.1. Métodos de valoración de la actividad

La actividad de las inmunotoxinas en los distintos sistemas experimentales, es valorada siempre con respecto a la que presentan cada uno de sus componentes (15,21,29,31,362).

Stirpe y col (362) estudiaron la inhibición de la síntesis de proteínas, en lisado de reticulocitos de conejo, de inmunotoxinas realizadas con la briodina y la momordina y el anticuerpo monoclonal OX7, que reconoce linfocitos T, calculando la concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la síntesis y en condiciones reductoras. Estos autores observaron que la reacción con SPDP no alteraba la actividad de las toxinas, mientras que la de los conjugados se reducía hasta en un 20%. Este hecho les sugirió que ambas toxinas, al igual que ocurre con la gelonina (31) y la saporina (335), cuando forman parte de las inmunotoxinas, han de liberarse del anticuerpo monoclonal para poder llevar a cabo su actividad enzimática (362).

Forrester y col (379) y Wawrzynczak y col (189) demostraron en experimentos similares, llevados a cabo con inmunotoxinas sintetizadas con Fib 75, AcMo dirigido contra las células EJ de carcinoma de vejiga humano, y la cadena A de la ricina (379) y la α -sarcina (189), respectivamente, que no se aprecian variaciones significativas en la actividad de inhibición de síntesis de proteínas para ninguna de las dos toxinas.

La valoración de la actividad de estas moléculas sobre líneas celulares en cultivo se realiza, normalmente, en experimentos de inhibición de la síntesis de proteínas en las células. Para ello, se determina el porcentaje de incorporación de aminoácidos marcados a las proteínas sintetizadas *de novo*, incubando las cultivos con leucina marcada con tritio (189,359,362), prolina marcada con tritio (332) o metionina marcada con azufre 35 (8,124,340,342).

En la mayoría de los casos, se considera como valor significativo del efecto de las inmunotoxinas, la estimación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de la síntesis de proteínas en las células ensayadas, definido como IC₅₀ (8) o ID₅₀ (337), y que supone la concentración que permite la supervivencia del 50% de las células. Blattler y col (31) utilizan el valor IC₃₇, como índice de la concentración de toxina que permite la supervivencia del 37% de las células, y Casellas y col (380) utilizan el concepto IC₉₀ como el tiempo necesario para que una determinada concentración de toxina o conjugado inhiba el 90% de la síntesis de proteínas en células.

Mientras que las inmunotoxinas realizadas con toxinas de

dobles cadenas presentan, por norma general, niveles de toxicidad menores o iguales a las toxinas nativas, los conjugados realizados con sus cadenas A o con toxinas de una sola cadena, son más activos sobre las células que las toxinas. Así, la unión de estas toxinas a anticuerpos monoclonales, hace que su actividad citotóxica aumente desde valores de IC_{50} de aproximadamente $10^{-6} M$ hasta valores entre $10^{-10} M$ y $10^{-12} M$ (189,335,330,342,362,365,366,381).

Este hecho ha permitido aplicar los conceptos de Factor Específico (15,21,332,380) o Índice Terapéutico (187) definidos como el cociente entre el valor de IC_{50} obtenido para la toxina y el valor de IC_{50} obtenido para la inmunotoxina sobre la misma línea celular.

Otros métodos utilizados en la valoración de la citotoxicidad de las inmunotoxinas han sido la estimación del número de células o de la capacidad de proliferación de las mismas, tras el tratamiento a distintos períodos de tiempo (8,281,370). En estos casos, se utiliza también el concepto de IC_{50} como concentración de proteínas que reduce el número de células a la mitad (8).

La eficacia de ambos métodos, inhibición de la síntesis de proteínas e inhibición de la proliferación celular, ha sido discutida por distintos autores. Según señalan Sung y col (370), determinados conjugados presentan mayor eficiencia cuando su actividad se mide como capacidad de inhibición de la proliferación de las células. Así, las inmunotoxinas realizadas con la cadena A de la ricina, que se presentaban menos activas que las realizadas con la toxina diftérica en inhibición de síntesis de proteínas, eran más efectivas cuando se determinaba la capacidad de proliferación celular a los 12 días del tratamiento (370).

Estos autores defienden que el ensayo de síntesis de proteínas, uno de los métodos más comúnmente utilizados, no supone una medida directa de la muerte celular y no permite determinar los efectos reales sobre las células cuando la diferencia de concentración de proteína oscila sólo en algunos órdenes de magnitud. La comparación entre la síntesis de proteínas y la eficiencia de la muerte celular sugiere que, cuando la inmunotoxina entra en contacto con la célula, además de la inhibición de la síntesis de proteínas, pueden desencadenarse otros mecanismos o procesos metabólicos (370).

Los estudios de actividad *in vivo* han sido llevados a cabo en ratones en los que se determinaba la capacidad de las inmunotoxinas para inhibir el crecimiento de tumores humanos, inoculados en el animal (324). Sólo en casos aislados se hicieron en cerdos de guinea (356). Estos animales eran inoculados por distintas vías con un número de células del tumor comprendido entre 10^6 y 10^7 (324).

Así, se valoró la capacidad de los conjugados para neutralizar el desarrollo del tumor en los ratones tras incubar las células tumorales con una concentración determinada de proteína (188), o la capacidad de los mismos para reducir el volumen de los tumores desarrollados en la cavidad intraperitoneal de ratones de la cepa nu/nu Balb/c (281).

En estos experimentos, tanto las inmunotoxinas sintetizadas con moléculas de toxinas completas o con sus cadenas A (281), como las realizadas con toxinas de una cadena (335), son capaces de bloquear el desarrollo del tumor o de inducir la regresión del mismo.

La valoración de dicha actividad también se realiza determinando el aumento del tiempo de supervivencia de los ratones tratados con las inmunotoxinas, en comparación con ratones no tratados (324). De esta manera, según describen FitzGerald y col (337), con las inmunotoxinas realizadas con el anticuerpo OVB3, que reconoce las células del carcinoma ovárico OVCAR-3, y la exotoxina A de *Pseudomonas*, se consigue prolongar la vida del animal hasta 3 veces cuando el conjugado se inocula entre 3 y 5 días después de la inyección de las células del tumor, mientras que su eficacia se reduce cuando éste se inocula entre las 2 y 4 semanas después de haber inoculado las células, momento en el que el tumor está ya establecido en el peritoneo. Este hecho permite deducir que la inmunotoxina tiene poca capacidad de penetración en el tumor sólido (295,337).

1.6.4.2. Modo de acción de las inmunotoxinas

La actividad de las inmunotoxinas sobre sus células diana está en función de gran variedad de factores, en los que están implicados, tanto las moléculas que la componen como las características que presenta el tumor (14).

Por un lado, son definitivos la afinidad del anticuerpo monoclonal por su antígeno (289), el número de moléculas expresadas en la superficie del tumor (8,290) y la regulación a que la expresión del antígeno tumor asociado esta sometido (382). Por otro lado, aunque la formación del complejo antígeno anticuerpo presente los parámetros más adecuados, muchos AcMos no son capaces de inducir la internalización de las inmunotoxinas (383).

Según apuntan Press y Vitetta (384), las inmunotoxinas que presentan alta afinidad por el tejido tumoral son rápidamente internalizadas en vesículas de endocitosis recubiertas de clatrina o de moléculas similares. Estas vesículas facilitan la entrada de los conjugados en el interior de la célula, donde determinados mecanismos han de permitir que las toxinas desarrollen su actividad enzimática (385).

En primer lugar, según han descrito distintos autores (124,159,362,385), tanto la ricina, su cadena A, como las toxinas compuestas por una sola cadena, y unidas a través de puentes disulfuro, se separan de la molécula de AcMo por reducción del enlace introducido entre ambos. La reducción de los enlaces S-S, ha sido atribuida a la presencia en el plasma de compuestos como el glutatión (336), cuya concentración oscila entre 0.5 mM y 10 mM (69). No se tienen datos sobre la posible disociación de las moléculas unidas a través de enlaces C-S.

A continuación, como ha sido comprobado en el caso de la toxina diftérica (124), las cadenas activas de las toxinas son traslocadas desde el interior de las vesículas al citoplasma, por mecanismos en los que están implicados procesos de acidificación

del medio intracelular.

Son pocos, sin embargo, los datos que se conocen acerca de del comportamiento de las inmunotoxinas en el citoplasma y del desarrollo de su actividad (366,385). Los datos aportados por Timar y col (151) sobre el procesamiento intracelular de los conjugados compuestos por la cadena A de la ricina y AcMos contra moléculas de HLA de clase I, incubadas en presencia de la cadena B de la ricina, demuestran que éstas aparecen en el aparato de Golgi, escapando a la degradación enzimática de los lisosomas. De aquí, al igual que ocurre con las moléculas de ricina completa (150), y a través de nuevas vesículas producidas en el Golgi, estas inmunotoxinas vuelven a la membrana celular de forma activa (151). Según apuntan Hudson y Grillo (158) las funciones del Golgi estarán estrechamente relacionadas con la translocación de las mismas.

Wiedlocha y col (366) comprobaron que no es posible generalizar este mecanismo, ya que los conjugados realizados con la viscumina y AcMos contra células de leucemia L1210V, son internalizados por mecanismos no dependientes de clatrina y, sin embargo, son igualmente eficaces. Este resultado indica que es posible obtener inmunotoxinas eficaces utilizando anticuerpos que no son internalizados por mecanismos de vesículas recubiertas (366).

Por tanto, como se recoge en la figura 1.14., las rutas que las inmunotoxinas pueden seguir en el interior de la célula, hasta llevar a cabo su actividad de inhibición de la síntesis de proteínas son muy diversas (385).

1.6.4.3. Potenciamiento de la actividad de las inmunotoxinas

Han sido utilizados distintos agentes con la intención de aumentar la actividad de las inmunotoxinas realizadas con la ricina (91,380,386) y la toxina diftérica (387).

Entre otros, se usan ionóforos monocarboxílicos, como la monensina y la nigericina (380), y aminas lisosomotrópicas, como el cloruro amónico o la cloroquina (91,386,387), que hacen disminuir el pH del interior de los lisosomas y de las vesículas endosómicas, lo que ha permitido ratificar los datos que se conocen sobre la actividad intracelular de las inmunotoxinas (124,158). También han sido utilizados agentes que bloquean los canales de calcio de la membrana celular, tales como las indolozinas, que según describen Jaffrézou y col (388), inducen fenómenos de lipidosis en los fosfolípidos de los lisosomas de la células debido a la activación de enzimas como la esfingomielinasa lisosomal. De esta forma, fue posible aumentar los niveles de toxicidad de conjugados realizados con la cadena A de la ricina hasta valores de IC_{50} próximos a 10^{-13} M (380).

Así mismo, Candiani y col (389,390) demuestran que la utilización de conjugados entre la monensina y la albúmina sérica humana (HSA), unidas a través de enlaces S-S (389) o de enlaces C-S (390) son capaces de potenciar, *in vivo*, la actividad de inmunotoxinas sintetizadas con la cadena A de la ricina.

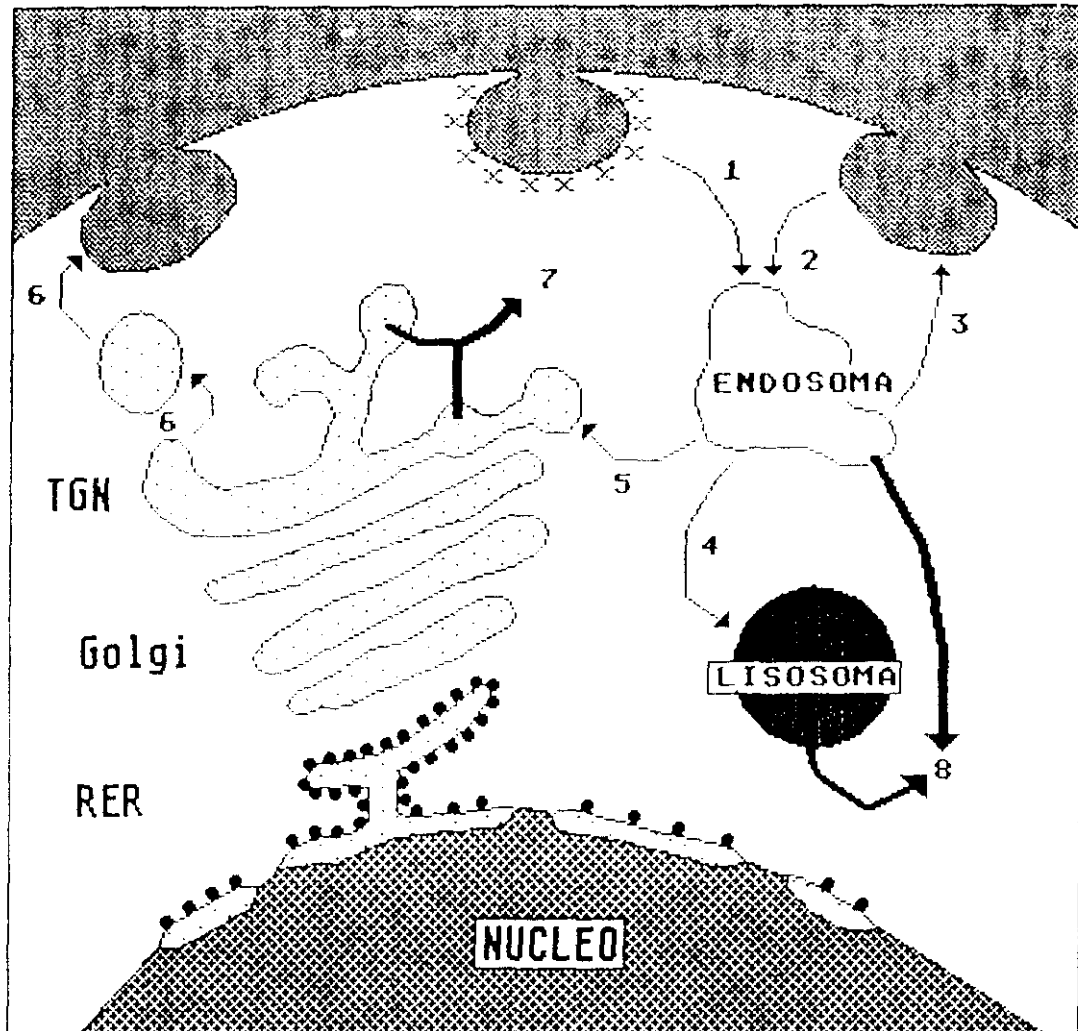


Fig. 1.14. Rutas intracelulares de las inmunotoxinas

En la figura se esquematizan las distintas rutas que pueden seguir las inmunotoxinas cuando entran en el interior de la célula, tras su interacción con los antígenos de membrana reconocidos por el anticuerpo monoclonal. El proceso se inicia con la endocitosis de los complejos inmunotoxina-antígeno en vesículas recubiertas de clatrina [1] o no recubiertas [2] formándose así vesículas endosómicas. Este material puede volver nuevamente a la membrana celular [3], unirse a lisosomas cargados de enzimas proteolíticos en donde será digerido [4] o fusionarse con las vesículas del Golgi (vesículas trans del Golgi o TGN) [5]. Algunas toxinas, tales como la ricina, puede salir desde el TGN al citoplasma [7], mientras que otras, como la toxina diftérica, lo hacen directamente desde los endosomas o los lisosomas, debido a fenómenos de acidificación de estas partículas [8]. Estas toxinas, una vez en el citoplasma, son capaces de llevar a cabo su actividad de inhibición de síntesis de proteínas. Por último, parte de las moléculas de ricina o incluso de inmunotoxina, pueden ser exportadas en vesículas desde el Golgi hasta el exterior de la célula [6]. El esquema ha sido tomado de Oeltmann y Franke (385).

Según distintos autores, la cadena B de las toxinas de doble cadena es capaz de potenciar la actividad de las inmunotoxinas realizadas con la correspondiente cadena A (151,391).

Vitetta y col (391) comprobaron que la actividad de los conjugados realizados con la cadena A de la ricina, podía ser potenciada con inmunotoxinas realizadas con la cadena B; existía, por tanto, un efecto sinérgico entre ambas moléculas. Más recientemente, Timar y col (151) demostraron que, en conjugados sintetizados con la cadena A y con AcMos contra células de la línea EJ de carcinoma de vejiga, se producía un efecto similar tras la adición de la cadena B.

Sin embargo, Wawrzynczak y col (368) no obtienen resultados similares, ni con la cadena B ni con inmunotoxinas realizadas con ella. Estos autores defienden que los sitios de unión a galactosa de la cadena B contribuyen a la citotoxicidad de la proteína de forma distinta según que la cadena B forme parte de la inmunotoxina o no (368).

Por último, Hudson y Grillo (158) demostraron, utilizando la Brefeldina-A, un metabolito de origen fúngico que bloquea la función del Golgi en células Jurkat, que esta sustancia, capaz de inhibir la citotoxicidad de la ricina, la modicina y la abrina, potencia la actividad de las inmunotoxinas sintetizadas con la cadena A de la ricina a concentraciones en las que no se ve afectada la acción de la toxina completa o la secreción de IL-2.

1.6.5. Cinética *in vivo*

La eficacia de las inmunotoxinas utilizadas en terapia, al igual que ocurre con los AcMos, está en función de su adecuada distribución por el organismo, ya que estas moléculas han de alcanzar las células del tumor para llevar a cabo su función (295). Una vez más, esta distribución depende de las características que presentan cada uno de sus componentes. Los estudios preliminares sobre la cinética de las inmunotoxinas se realizan, generalmente, en ratón, rata y conejo (69,189,343,392-396).

Las inmunotoxinas realizadas con la cadena A de la ricina, sufren un rápido aclaramiento en plasma debido a la presencia de restos de carbohidratos en la molécula de toxina (343,392). Según apuntan Blakey y col (343), aproximadamente un 1% de los conjugados realizados con OX7 y la cadena A de la ricina se mantienen en sangre tras las 24 horas de inyección intraperitoneal, en comparación con un 30% del anticuerpo nativo.

Este rápido aclaramiento es debido, principalmente, al reconocimiento de los residuos de manosa o de fucosa presentes en la cadena A de la ricina y que tienen receptores en el hígado y en otros órganos (343). Tanto la ricina (393), su cadena A (69) como las inmunotoxinas realizadas con ambas (392), llegan hasta en las células hepáticas, *in vitro* e *in vivo*, a través de una ruta que puede ser antagonizada por glicoproteínas y sacáridos con terminaciones de manosa y fucosa. En las ratas, las células hepáticas que captan la RCA son las que componen la fracción reticuloendotelial y no las no células parenquimales, mientras que en ratón, son ambas fracciones celulares las que están

implicadas en el reconocimiento de la toxina (393).

De esta forma, cuando se utiliza la molécula de RCA deglicosilada, las inmunotoxinas aparecen en el plasma hasta 48 horas después, mientras que la RCA completa desaparece a las 24 horas (343). A este tiempo, aún permanece un 10% en plasma de los conjugados realizados con la cadena A de la ricina deglicosilada (343).

Las inmunotoxinas realizadas con las cadenas A de las toxinas completas, o con distintas toxinas de una sola cadena, y el anticuerpo monoclonal Fib75, presentan una cinética bifásica durante las 24 primeras horas (189,394). De manera que, los valores obtenidos en ratas Wistar del tiempo medio de distribución ($t_{1/2\alpha}$) van desde las 0.8 horas para la α -sarcina, hasta las 0.4 horas para la gelonina, y los valores del tiempo medio de eliminación ($t_{1/2\beta}$) van desde las 8 horas para la gelonina a las 9 horas para la momordina (189). Esta cinética bifásica ha sido atribuida por Wawrzynczak y col (189) a que la introducción de los grupos bifuncionales PDP, en las moléculas de toxina hace que aparezcan distintas especies moleculares, mono o disustituídas, que se comportarán, *in vivo*, de forma distinta.

También ha sido estudiada la cinética de las inmunotoxinas sintetizadas con fragmentos de anticuerpos monoclonales. Los datos aportados por Thorpe y col (335) en estudios realizados sobre la cinética de inmunotoxinas con saporina y el anticuerpo OX7 en ratones, demuestran que los fragmentos $F(ab')_2$ son retirados rápidamente de la circulación, ya que éstos no presentan restos de carbohidratos y las moléculas del conjugados son dirigidas rápidamente hacia el hígado, al igual que ocurre con los complejos antígeno-anticuerpo, donde causan un alto grado de toxicidad.

Por otro lado, los fragmentos $F(ab')_2$ presentan una vida media muy corta, comparado con la molécula de IgG completa. El fragmento $F(ab')_2$ de OX7 tiene una vida media en plasma de 9.5 horas, mientras que este valor es de 8.7 días para el AcMo OX7 intacto (335).

1.6.6. Aplicaciones

1.6.6.1. Tratamiento de distintos tipos de tumores

Las primeras inmunotoxinas fueron aplicadas en los trasplantes autólogos y alogénicos de médula ósea (30,292,357,367,386,397-401). En los trasplante autólogos, la médula ósea de los pacientes afectados de leucemia era tratada *ex vivo* con distintas inmunotoxinas, dirigidas contras antígenos expresados en la superficie de las células leucémicas, de manera que se obtenía la eliminación de casi el total de las células tumorales (397-400). Para aumentar la eficacia de los conjugados, el tratamiento se complementaba con distintos agentes quimioterápicos, tales con la mafosmamida (398) o la 4 hidroperoxíciclofosfamida (399), o se utilizaban agentes como el cloruro amónico (386,400). Por otro lado, han sido combinadas con sustancias quimioterapéuticas para aumentar la deplección *ex vivo* de las células T (397).

En el caso de los trasplantes alogénicos, la médula ósea del donante era tratada con las inmunotoxinas, eliminándose así los linfocitos T del donante, causantes de la enfermedad del injerto contra huésped (GvHD), que es el motivo más frecuente de rechazo del trasplante (292,367). Con esta terapia, la incidencia de la enfermedad en los pacientes transplantados, se reducía casi completamente.

Según describen Casellas y col (400) en trasplantes autólogos, y Katz y col (292) en trasplantes alogénicos, cuando se utilizaban en el tratamiento inmunotoxinas con AcMos contra las células T, se obtenían niveles de deplección de entre un 99.6% y 99.9%, sin que se vieran afectadas las poblaciones de células hematopoyéticas stem o progenitoras.

En la mayoría de los casos, estos ensayos fueron realizados con inmunotoxinas que contenían moléculas de ricina completa (398,399) o su cadena A (292,400). Han sido utilizadas también inmunotoxinas sintetizadas con moléculas de PAP (357).

La prevención del desarrollo de la GvHD tras el trasplante, o el tratamiento de las fases agudas de la enfermedad, y la eliminación de las células leucémicas de la médula ósea han sido realizados, posteriormente, en ensayos clínicos *in vivo* (30, 401,402). En todos los ensayos realizados de este tipo se han obtenido muy buenos resultados. Incluso, las inmunotoxinas sintetizadas con anti CD5 y la cadena A de la ricina, han resultado activas en aquellos casos de GvHD en los que las células desarrollaban resistencia a esteroides (30). Según apuntan FitzGerald y Pastan (29), los conjugados dirigidos contra los antígenos CD3, CD5 y contra el receptor de la IL2 son los candidatos para prevenir la destrucción del injerto mediado por células T.

En los trasplante alogénicos, estas inmunotoxinas dirigidas contra los linfocitos T reducen la incidencia de GvHD, pero no permiten eliminar las células NK (natural killer) presentes en la médula ósea del donante, y que representan la segunda causa del rechazo observado en modelos animales (7). Por tanto, sería necesario utilizar inmunotoxinas contra células T y contra células NK (7).

Posteriormente, estos conjugados fueron aplicados en el tratamiento sistémico de distintas enfermedades *in vivo*, en numerosos ensayos clínicos de fase I y fase II. De esta manera, han sido utilizados, o están siendo utilizados, en el tratamiento de leucemias linfoides crónicas (403), en linfomas de células B (295), en melanoma (404,405), en cáncer de colon (406) y en carcinoma mamario (353), utilizando inmunotoxinas sintetizadas con distintos AcMos o sus fragmentos Fab', conjugados con la cadena A de la ricina (404-406), la cadena A deglicosilada (295) o recombinante (353). Pai y col (136) han empleado conjugados realizados con la exotoxina A de *Pseudomonas* y el anticuerpo OVB3 en el tratamiento de pacientes con carcinoma ovárico.

Estas inmunotoxinas permiten obtener, en la mayoría de los casos, remisiones parciales (353,404,406) que, a veces, superan el 50% de la extensión del tumor (295). Algunos ejemplos de

inmunotoxinas realizadas con toxinas protéicas, algunas de las cuales han sido utilizadas ya *in vivo*, quedan recogidas en la tabla 1.3.

1.6.6.1.1. Problemas derivados de la aplicación clínica de las inmunotoxinas

Pero, para conseguir aumentar la eficacia de las mismas, es necesario tener en cuenta algunos de los aspectos derivados de su aplicación *in vivo*, relacionados con las características de sus componentes.

En primer lugar, las moléculas inoculadas en pacientes originan toxicidades inespecíficas propias de sus componentes (136,298,343). Las inmunotoxinas realizadas con la cadena A de la ricina, inoculadas en dosis relativamente elevadas, dañan las células del sistema retículo endotelial, causando una hepatotoxicidad elevada en el hígado (298,343). Esta alta toxicidad hepática ha sido atribuida, tanto a la molécula de toxina (343) como a las porciones Fc de los AcMo (298).

Según describen Pai y col (136), la falta de eficiencia de las inmunotoxinas sintetizadas con el AcMo OVB3 y la exotoxina A de *Pseudomonas*, cuando es aplicada en pacientes afectados de carcinoma ovárico, se basa en la reacción del anticuerpo monoclonal con células normales del cerebro. Ha sido observada una reacción cruzada del AcMo con las neuronas de la capa prominente del cerebelo, que ocasiona una alta citotoxicidad en los pacientes y que no había sido apreciada en los ensayos previos a la aplicación clínica, realizados en animales (136).

En segundo lugar, los puentes disulfuro introducidos entre la toxina y el AcMo, son susceptibles de ser reducidos en el plasma y en distintos órganos, de manera que, parte de las moléculas de inmunotoxinas darán origen a moléculas de toxina libre y de AcMo, que presentan una vida media más larga en circulación que las propias inmunotoxinas (335,336).

Aspectos como la vida media de las inmunotoxinas o la existencia de anticuerpos en circulación, hacen que la capacidad de actuación de estas moléculas se vea interferida. Los valores de vida media de los conjugados sintetizados con ricina completa están entre los 43 minutos (404) y los 30 minutos (406), mientras que, con la cadena A de la ricina deglicosilada, se llegan hasta los 83 minutos (295). Por otro lado, el alto peso molecular de las inmunotoxinas (comprendido entre 180.000 y 230.000) dificulta la penetración en los tumores (296), por lo que, cuanto más tiempo esté en plasma, su grado de efectividad será mayor (295).

En tercer lugar, en muchos pacientes existen anticuerpos que neutralizan la actividad de las porciones tóxicas de los conjugados (29). Por esta razón, los investigadores clínicos evitan utilizar la toxina diftérica (DT) en sus conjugados, ya que las vacunas contra la difteria, la toxina pertusis y el tétano, hace a los humanos inmunes a esta toxina y algunas de las personas vacunadas mantienen en circulación anticuerpos contra la toxina durante años (29). Sin embargo, sólo un porcentaje

inmunotoxina	isotipo AcMo	célula diana	actividad		referencia
			toxina (M)	conjugado (M)	
RICINA Y SUS DERIVADOS					
T101-ricina	IgG2b	CEM leucemia T	3ng/ml	3ng/ml	281
T101-ricina A	IgG2a	CEM leucemia T	3ng/ml	4ng/ml	281
MBr1-ricina A	IgM	MCF-7 mamario	2.0x10 ⁻⁶	1.0x10 ⁻⁸	332
MoV 2-ricina A	IgM	HT-29 c6lon	2.0x10 ⁻⁷	1.6x10 ⁻⁹	332
Fib75-ricina A	IgG2a	EJ vejiga	0.18x10 ⁻⁶	0.32x10 ⁻⁹	189
OX7-ricina A	IgG1	AKR-A	1.0x10 ⁻¹¹	3.0x10 ⁻¹¹	335
Anti Thy1.1-dgA ⁽¹⁾	IgG1	EL4	—	—	8
Fab'-RFB4-dgA		RFB4+Daudi	—	1.0x10 ⁻¹¹	295
528IgG-ricina A recombinante	IgG2a	α EGFr A431	1.0x10 ⁻⁶	1.0x10 ⁻¹¹	8
B4-Ricina bloqueada ⁽²⁾	IgG	Namalwa (linfoma Burkitt)	1.3x10 ⁻⁸	1.3x10 ⁻¹¹	375
B4-RCA ¹	IgG	Namalwa	3.0x10 ⁻⁷	0.2x10 ⁻⁸	375
TOXINAS VEGETALES CON UNA SOLA CADENA					
Fib75-gelonina	IgG2a	EJ vejiga	—	8.2x10 ⁻¹⁰	359
Fib75-momordina	IgG2a	EJ vejiga	—	5.4x10 ⁻¹⁰	359

¹).El valor aportado de citotoxicidad ha sido determinado como IC₃₇ (375).

²).Utilizado en estudios de internalización de anticuerpos monoclonales.

RCA = Cadena A de la ricina, dgA = cadena a de la ricina deglucosilada.

Tabla 1.3.

inmunotoxina	isotipo AcMo	célula diana	actividad		referencia
			toxina (M)	conjugado (M)	
OX7-momordina anti Thy 1.1	IgG1	EL4, AKR-A linfomas	$>3.3 \times 10^{-7}$	1.2×10^{-9}	362
MoAb16-viscumina A	IgM	L1012V leucemia	0.5×10^{-9}	0.5×10^{-10}	366
OX7-briodina anti Thy 1.1	IgG1	EL4, AKR-A linfomas	2.0×10^{-7}	5.0×10^{-11}	362
OX7-saporina	IgG1	AKR-A AKR T linfomas	2.0×10^{-7} 1.0×10^{-8}	3.0×10^{-11} 1.0×10^{-10}	335
OX7F(ab') ₂ -saporina		AKR-A linfomas	2.0×10^{-7}	1.0×10^{-11}	335
T3-3A1-PAP ⁽³⁾	IgG1	3A1, linfocito T humano	—	—	122
5E9-11-PAP ⁽³⁾	IgG1	Receptor transferrina humano	—	—	122
31-E6-PAP ⁽³⁾	IgG2b	Thy 1.1 murinos	—	—	122
8-A-momorcochina-S	IgG	Raji células B humanas	$>1.0 \times 10^{-6}$	5.2×10^{-9}	66
5E9-C11-lufina II ⁽⁴⁾	IgG	HSB-2 Leucemia Linfoblástica de células T	—	5.2×10^{-11}	365
AT15E-tricokirina	IgG2c	T2 y EL4 Leucemia murina Thy 1.2 de rata	1.0×10^{-5}	8.0×10^{-11}	476

³⁾ Los autores sólo determinan la cinética de las inmunotoxinas y no su actividad en células en cultivo.

⁴⁾ El valor de citotoxicidad aportado por Ramakrishnan y col(365), representa un porcentaje de inhibición de un 72.5% en células HSB-2.

PAP = proteína antiviral de las hojas de *Phytolacca americana*

Tabla 1.3.

inmunotoxina	isotipo AcMo	célula diana	actividad		referencia
			toxina	conjugado	
TOXINAS BACTERIANAS Y FUNGICAS					
EGFr-fragmento A toxina diftérica	---	3T3	no tóxica	3.0x10 ⁻⁸	481
454A12-CRM 107 Toxina diftérica recombinante	IgG1	K562 leucemia humana	---	1.0x10 ⁻¹¹	370
JLI-exotoxina A <i>Pseudomonas</i>	IgG2a	MCF-7 mamario	1.0x10 ⁻¹⁰ ,	1.0x10 ⁻¹¹	342
anti-Tac(Fv)-PE40 (<i>Pseudomonas</i> recombinante)	IgG	HUT-102 (alta expresión receptor IL-2)	---	0.15 ng/ml	32
anti-Tac-PE <i>Pseudomonas</i>	IgG	HUT-102	---	1.22 ng/ml	32
Fib75-α-sarcina	IgG2a	EJ vejiga	0.36x10 ⁻⁶	0.46x10 ⁻⁹	189

Tabla 1.3. Inmunotoxinas

En la tabla se recogen algunos de los conjugados realizados entre proteínas tóxicas y distintos anticuerpos monoclonales que reconocen células tumorales. En cada caso ha sido recogido la denominación de la inmunotoxina, el isotipo del anticuerpo monoclonal y la célula diana contra la que esta moléculas están dirigidas. Así mismo, se recoge la actividad de la toxina y del conjugado sobre dichas células diana.

inferior al 5%, presentan títulos de anticuerpos capaces de neutralizar la acción de la exotoxina de *Pseudomonas*, mientras que no se encuentra respuesta, casi nunca, contra la ricina de forma natural (29,342).

En todos los ensayos clínicos realizados se detectó la aparición de respuesta inmune contra las inmunotoxinas, que se pone de manifiesto con la presencia en el plasma de anticuerpos específicos contra el AcMo (respuestas HAMA), contra la toxina o contra la molécula completa del conjugado (136,404,406). Estas respuesta inmune se desarrollan entre los 14 y 20 días después de la primera inoculación de la inmunotoxina, y reduce la posibilidad de posteriores aplicaciones si los pacientes no son severamente inmunodeprimidos (404).

En cuarto lugar, muchas inmunotoxinas presentan sólo una moderada actividad en las líneas celulares en cultivo (363,365, 366,381). Vitetta y col (295) señalan que las inmunotoxinas que presentan en inhibición de síntesis de proteínas, *in vitro*, un valor de IC₅₀ de 10⁻¹⁰ M o mayor, no pueden ser utilizadas en la clínica. De esta forma, están siendo aplicados conjugados con valores de IC₅₀ de 10⁻¹² M (136,295,350).

Por otro lado, son también decisivos los aspectos relacionados con la naturaleza del tumor. Según varios autores, los carcinomas mamarios, de colon y melatomas son de más difícil tratamiento ya que, su vascularización hace que las células tumorales no sean accesibles a las inmunotoxinas inoculadas por vía intraperitoneal o intravenosa (295,296,337,404), de manera que, éstas no siempre llegan a alcanzar la masa tumoral. Según describen Spitler y col (404), es posible localizar las inmunotoxinas antimieloma AcMo-cadena A de la ricina en la superficie del tumor e, incluso, después de 24 horas tras la inoculación, se encuentra en las metástasis del mismo.

En el caso de tumores accesibles, tales como las leucemias linfoides crónicas, la mayoría de las células circulantes no son capaces de internalizar las inmunotoxinas (295).

La dosis de inmunotoxina tolerada por los pacientes dependen tanto de la molécula inoculada como de las características que presenta el tumor (295,404). Los niveles máximos inoculados han sido de hasta 300 mg totales, administrados en varias dosis (404).

En todos los casos, los pacientes han presentado síntomas muy similares, derivados de la administración de las inmunotoxinas (136,295,404,406). Los más destacados son un descenso de la concentración de albúmina en el suero (hipoalbuminemia en suero), aumento del peso corporal de hasta 3.3 kg (entre 1.8 y 8.6 kg), fiebre, taquicardias, descenso del voltaje del electrocardiograma, mialgias, edema periférico y anorexia y náuseas.

Según apuntan Spitler y col (404), algunos de estos síntomas, tales como la fiebre, el descenso del apetito o mialgias, que podrían ser atribuibles a la presencia de endotoxinas en la muestra inoculada, no son explicables por tal causa ya que estas muestras han de pasar los controles pertinentes de toxicidad establecidos en la legislación de cada país para muestras

utilizadas en ensayos clínicos.

1.6.6.1.2. Nuevas estrategias empleadas

Todos los aspectos comentados hasta el momento, están en proceso de análisis con el fin de determinar nuevas estrategias para la aplicación de las inmunotoxinas (121,295,385,405). Vitetta y col (295) describen recientemente, en estudios realizados con conjugados entre la cadena A de la ricina deglicosilada y el anticuerpo monoclonal RFB4, sintetizado contra el antígeno CD22 de células linfoides B, como los fragmentos Fab' puede presentar ventajas con respecto a la molécula de IgG completa.

En primer lugar, estos fragmentos permiten la obtención de una inmunotoxina más pequeña, de aproximadamente 80.000 de peso molecular, que tendrá mayor eficacia para penetrar en los tumores sólidos (295); en segundo lugar, cualquier fragmento Fab' liberado por reducción *in vivo*, será rápidamente eliminado de la circulación, por lo que no entrará en competencia con la inmunotoxina por la unión con la célula (336). Por otro lado, el Fab' no puede unirse a los receptores reconocidos por Fc en distintas células y tampoco tendrá lugar una respuesta inmune contra dicho fragmento; así, solo 4 de los 15 pacientes tratados por estos autores, desarrollan respuesta inmune contra el conjugado entre los días 28 y 42 después de iniciado el tratamiento, mientras que ninguno de ellos desarrolla respuesta contra el fragmento de la inmunoglobulina (295).

Como aspectos negativos apuntan que estos conjugados realizados con los Fab' son más rápidamente eliminados de circulación, presentan menor toxicidad en animales, menor estabilidad, menor potencia y un mayor coste de producción que el conjugado entre la molécula completa de IgG y la RCA deglicosilada (295,350,407).

Tras los primeros ensayos clínicos realizados, los experimentos planteados parten de las siguientes consideraciones: en primer lugar, como la expresión de los antígenos es heterogénea en las células del tumor, se piensa en recurrir a la utilización de inmunotoxinas dirigidas contra más de un antígeno, que, combinadas con la terapia convencional, puedan eliminar las células residuales del tumor (295,405), y por otro lado, la corta vida media de las inmunotoxinas, que está en relación con su actividad, puede solucionarse, según apuntan Vitetta y col (295) con la administración de dosis continuas.

El ensayo clínico de fase II, llevado a cabo por Oratz y col (405) con una inmunotoxina contra melanoma utilizando la cadena A de la ricina combinado con ciclofosfamida, apuntan en esta dirección.

1.6.6.2. Otras aplicaciones

Una de las múltiples posibilidades que ofrecen estos agentes inmunoterapéuticos es su uso en técnicas de terapia localizada (33,390).

Johnson y col (33) describen la aplicación de inmunotoxinas sintetizadas con un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la transferrina y la molécula recombinante CRM107, derivada de la toxina diftérica, en el tratamiento de tumores de origen nervioso, tales como glioblastomas, meduloblastomas y de metástasis de tumores primarios localizados en el fluido cerebroespinal. Estos conjugados son inyectados directamente en la médula ósea de manera que, los animales inyectados, cerdos de gineá y monos rhesus, soportan concentraciones elevadas de inmunotoxinas en el fluido cerebroespinal, que llegan a ser del orden de 2×10^{-9} M y que son capaces de eliminar las células del tumor (33).

La utilización de inmunotoxinas constituidas por AcMos que reconocen las moléculas expresadas por distintos oncogenes, ha dado resultados muy interesantes. Así, Hynes y col (408) describen la construcción de una molécula recombinante que contiene los fragmentos Fv del anticuerpo monoclonal FRP5, que reconoce la proteína erbB-2 producto del oncogen c-erbB-2, y el gen que codifica para la exotoxina A de *Pseudomonas*. Estas inmunotoxinas han demostrado su capacidad para inhibir el desarrollo de los tumores que expresan la proteína en la membrana de las células tumorales (408).

Según describe Vitetta (409), estos conjugados pueden ser utilizadas en el estudio y en la terapia de enfermedades autoinmunes o en el tratamiento de tumores que presentan alteraciones en la expresión de los antígenos de clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (409-411).

Por otro lado, también están siendo utilizadas en el estudio y tratamiento de enfermedades infecciosas en las que están implicados procesos víricos. Ghetie y col (254,412) han sintetizado inmunotoxinas compuestas por AcMos contra el antígeno CD4 recombinante, o no recombinante, y ricina A deglicosilada, para matar células humanas T infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Flavell y col (253) utilizan anticuerpos biespecíficos o sus fragmentos (Fab')₂, que reconocen por un lado el receptor CD7 de los linfocitos T y por otro la molécula de gelonina, en la eliminación de las células T de leucemias agudas en niños. De esta forma demuestran que los anticuerpos biespecíficos son capaces de transportar las moléculas de gelonina al interior de las células leucémicas y defienden que este tipo de moléculas pueden suponer una alternativa a las inmunotoxinas, con ventajas sobre aquellas en la aplicación *in vivo* (253).

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

2.1.1. Toxinas

Las características de las toxinas utilizadas se reflejan en la tabla 2.1.

2.1.1.1. Aspergilinas

La α -sarcina fue purificada a partir del medio de cultivo de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, según se describe en el apartado 2.6.1. La cepa de *A. giganteus* fue cedida amablemente por el Dr. Ulbrich, del *Institut fur Biochemie* de la "Universidad Libre de Berlín", Alemania.

La restrictocina y la mitogillina, purificadas de dos cepas distintas de *A. restrictus* por Olson y col (42,191), fueron cedidas amablemente por el Dr. David Vázquez del "Centro de Biología Molecular" de la "Universidad Autónoma de Madrid".

2.1.1.2. Toxinas vegetales

La ricina fue purificada a partir del extracto de las semillas decorticadas de *Ricinus communis* L., utilizando el método de Olsnes y col (413) según se describe en el apartado 2.6.2. Las semillas fueron recolectadas en Nerja, Málaga, (España) de arbustos de *R. communis* L. (ver figura 2.1.)

La briodina se purificó a partir del extracto acuoso de los frutos de *Bryonia dioica* Jacq., según el método descrito por Stirpe y col (52) y recogido en el apartado 2.6.3. El material de partida fue recolectado en los alrededores de la presa del Atazar (Madrid, España). También se utilizó una muestra de briodina obtenida de Calbiochem (Behring Diagnostics, La Jolla, CA, USA). (ver figura 2.2.)

La cadena A de la ricina purificada (RCA) y la proteína antiviral de *Phytolaca americana* L. (PAP) han sido obtenidas, así mismo, de Calbiochem, y la gelonina de *Gelonium multiflorum* L., de Inland Laboratories (Austin, Texas, USA).

2.1.2. Líneas celulares

Las distintas líneas tumorales humanas utilizadas en este trabajo quedan recogidas en la tabla 2.2. y el aspecto que presentan los cultivos de algunas de ellas en la figura 1.3. Las líneas SW626 (carcinoma ovárico), MeWo (melanoma), HT-144 (melanoma) y Malme-3M (melanoma) fueron cedidas amablemente por el Dr. J. Fogh del *Memorial Sloane-Kettering Cancer Center* de Nueva York (USA), mientras que la línea OVCA 432 (carcinoma ovárico) fue cedida por el Dr. R. Knapp del *Dana Faber Institute* de la ciudad de Boston en Massachusetts (USA) y las líneas MCF-7 (carcinoma mamario), HT-29 (carcinoma de colon) y A431 (carcinoma epidermoide vulvar) fueron obtenidas de la colección ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).

toxina	origen	peso molecular (mw)	p.I.	glucosilación (%)	ref.
TOXINAS VEGETALES					
ricina	semillas de <i>Ricinus communis</i>	59.000 (29.000 + 30.000)	5.9	5.25	72,74,77
RCA ¹	semillas de <i>Ricinus communis</i>	29.300	7.3	5.2	59,72,74
briodina	raíces de <i>Bryonia dioica</i>	30.000	>9.5	6.3	52
gelonina	semillas de <i>Gelonium multiflorum</i>	30.000	8.1	4.4	84
PAP ²	hojas de <i>Phytolacca americana</i>	29.000	8.4	n.d.	54
ASPERGILINAS (<i>Aspergillus</i>)					
α-sarcina	medio de <i>A. giganteus</i> MDH18894	16.987	>10.7	n.d.	40,193,244
mitogillina	medio de <i>A. restrictus</i>	16.867	9.7	n.d.	179,201
restrictocina	medio de <i>A. restrictus</i>	16.836	>10.0	n.d.	42,195

Tabla 2.1. Toxinas

En la tabla se recogen las principales características de las toxinas utilizadas en esta tesis, clasificadas según su procedencia. En cada caso se indica su origen, el peso molecular estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas o a partir del análisis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, así como el punto isoeléctrico y el grado de glucosilación que presentan. Las cepas de *A. restrictus* de las que han sido aisladas la mitogillina y la restrictocina quedan recogidas en el apartado 1.3.5.2. Por otro lado, en el caso de la ricina, única toxina con más de una cadena polipeptídica, se indica entre paréntesis los pesos moleculares de sus cadenas A y B, respectivamente.

Las abreviaturas utilizadas en la tabla son las siguientes:

¹RCA = cadena A de la ricina

²PAP = "Pokeweed antiviral protein", proteína antiviral aislada de las hojas de *Phytolacca americana*
n.d. no se detecta la presencia de hidratos de carbono en la molécula por el método de Dubois y col (426) o por métodos similares de determinación.



Figura. 2.1. *Ricinus communis* L.

El Ricino o *Ricinus communis* L., de cuyas semillas se purifica la ricina, pertenece a la familia de las Euforbiaceas. Es una planta anual, cuyas hojas palmeadas se disponen sobre troncos largos que pueden volverse casi arbórea, llegando a alcanzar hasta 12 ó 13 metros (figura A). Las flores forman racimos disponiéndose las flores masculinas en la parte baja del racimo y las femeninas en la parte alta. Los frutos son cápsulas espinosas, cada uno con varias semillas (figura B). La descripción y la figura A han sido tomadas de Woodward (481).

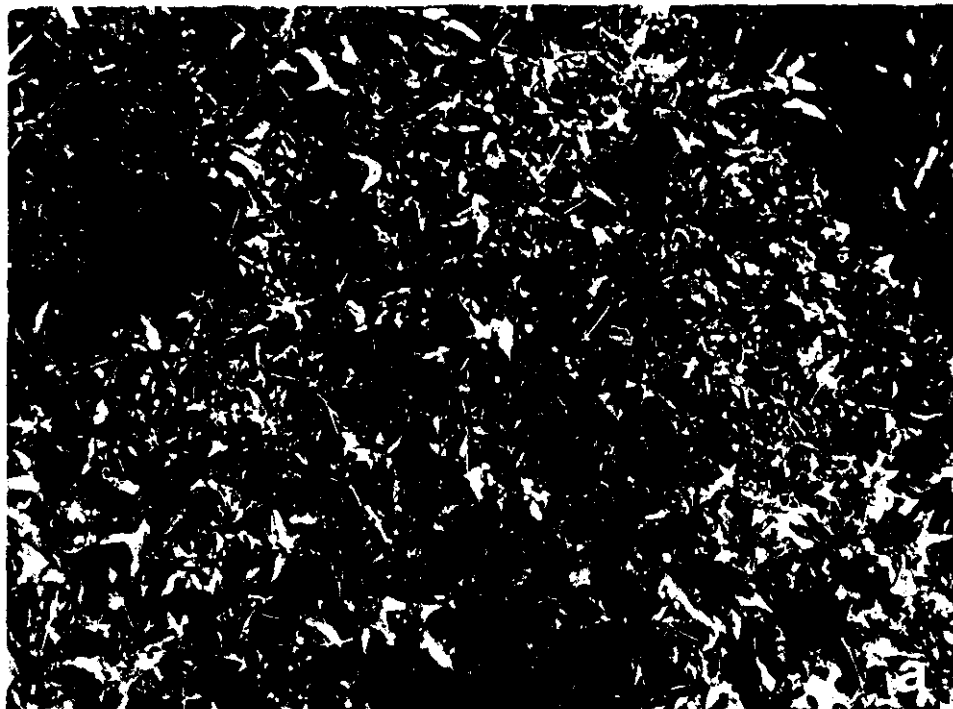


Figura 2.2. *Bryonia dioica* Jacq.

La *Bryonia dioica* Jacq., de donde han sido purificadas las toxinas denominadas briodina, a partir de las raíces, y bridiofina, a partir de los frutos, pertenece a la familia de las Cucurbitaceas, es una planta trapadora, de raíces tuberosas, tallos largos y hojas palmadas, con pequeñas flores verdes en grupos de hasta 5 flores. Los frutos son bayas rojas o naranjas con semillas de color negro amarillento. La planta pierde cada año toda la parte aérea, conservándose la raíz.

La descripción ha sido tomada de Woodward (481). Figura A: aspecto de una planta de *B. dioica*, Figura B: detalle de las hojas y de los frutos verdes y maduros.

línea celular	origen	fuelle
MCF 7	Adenocarcinoma de mama	3
HT-29	Adenocarcinoma de colon	3
SW626	Adenocarcinoma ovárico	1
OvCa 432	Carcinoma ovárico	2
A 431	Carcinoma epidermoide vulvar	3
MeWo	Melanoma	1
HT-144	Melanoma	1
Malme-3M	Melanoma	1

Tabla 2.2. Líneas tumorales humanas

En la tabla aparecen recogidas las distintas líneas tumorales humanas utilizadas en este trabajo, indicándose el origen de cada una de ellas así como la fuente de donde han sido obtenidas y que son las siguientes: 1. Dr. J. Fogh del Memorial Sloane-Kettering Cancer Center, de Nueva York (USA); 2. Dr. R. Knapp, del Dana Faber Institute, Boston, Massachusetts (USA); y 3. de la colección ATCC (American Type Culture Collection), Rockville, Maryland (USA).

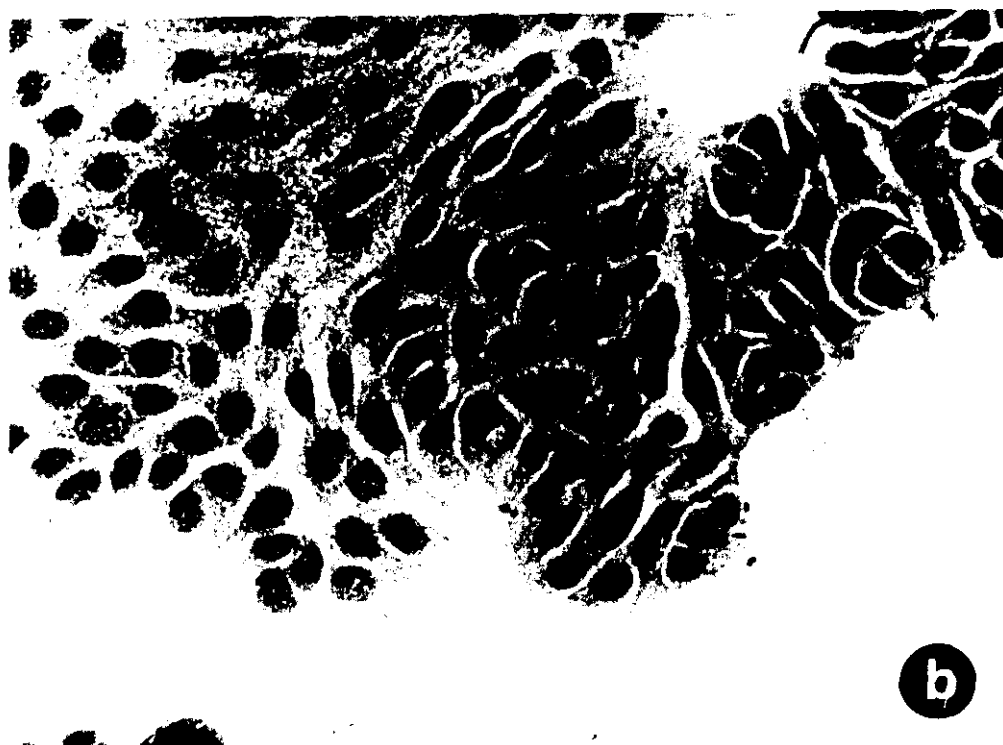
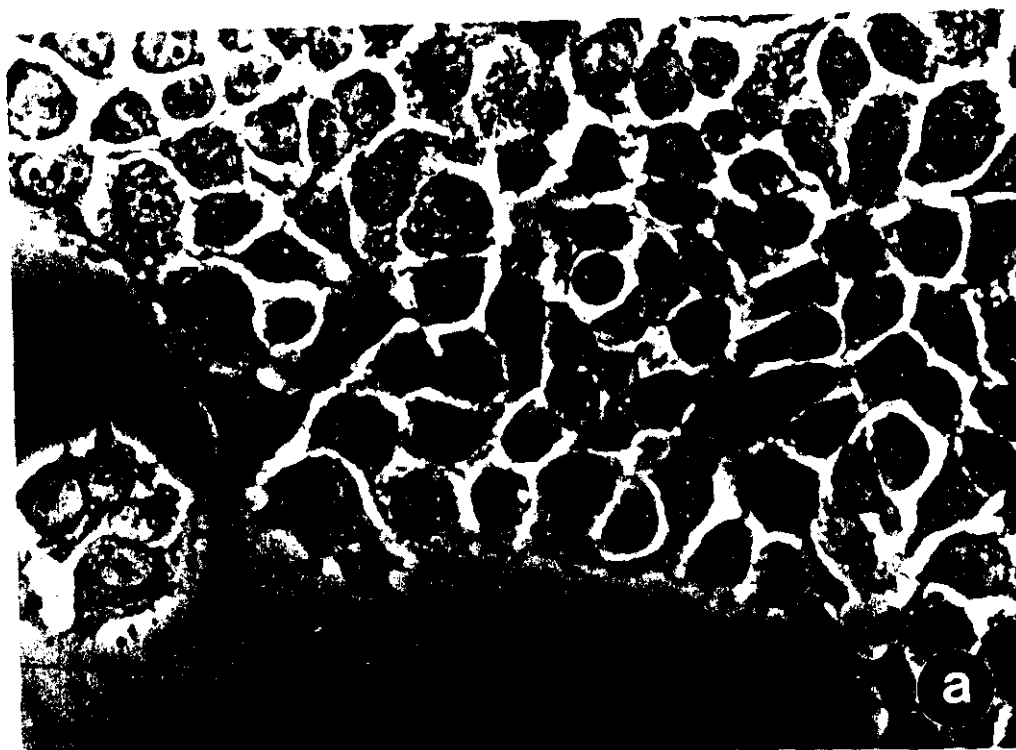


Figura 2.3. Líneas celulares tumorales humanas

En las fotografías se puede observar el aspecto que presentan los cultivos de dos de las líneas tumorales humanas que han sido utilizadas en este trabajo. La figura A) corresponde a células de la línea MCF 7, un adenocarcinoma de mama y en B) células de la línea HT-29, un adenocarcinoma de colon (ver tabla 2.2.). Ambas líneas celulares crecen, al igual que el resto de las líneas celulares que aquí se describen, adheridas a la superficie del recipiente de cultivo. Las fotografías han sido tomadas de García Juberías (232) y fueron realizadas con una ampliación 200x.

2.1.3. Antisueros

2.1.3.1. Antisueros policlonales

Los antisueros policlonales contra la α -sarcina, la mitogillina y contra la ricina, fueron obtenidos utilizando conejos New Zeland con pesos comprendidos entre 3 Kg y 3.5 kg, proporcionados por la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital "Ramón y Cajal", y mantenidos en las instalaciones del animalario de dicha Unidad en jaulas independientes y convenientemente identificados. Los protocolos de inmunización utilizados para cada animal se recogen en el apartado 2.5.1.

Se emplearon también antisueros de conejo contra la α -sarcina, la mitogillina y la restrictocina, obtenidos por Conde y col (200) y que habían sido conservados liofilizados. Estos antisueros fueron resuspendidos en tampón PBS a razón de 10 mg/ml y centrifugados a 27.000 g durante 20 minutos a 4°C, antes de su utilización.

2.1.3.2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales MBr 1, MoV 2, MoV 17, MoV 18, MoV 19, MLuC 1, MLuC 2 y MINT-5, fueron purificados y caracterizados en la *Divisione di Oncologia Sperimentale E* del *Istituto Nazionale dei Tumori*, de Milán (Italia) a partir de hibridomas de ratón obtenidos en dicho laboratorio (12,24,265,266,276,414,415, 416). Las características más destacadas de estos anticuerpos se recogen en las tablas 2.3. a 2.5. y el método de obtención y purificación en los apartados 2.5.1.4. y 2.5.2.3., respectivamente.

Dos de estos anticuerpos, MBr1 y Mov 2, son inmunoglobulinas de clase IgM, mientras que los demás pertenecen a la clase IgG y, dentro de esta, a las subclases IgG1 e IgG2a (ver tabla 2.3.). Todos ellos, excepto MINT 5, reconocen, de forma mayoritaria, epítopos de antígenos expresados en la membrana de las líneas celulares tumorales contra las que han sido sintetizados, aunque presentan también reacción cruzada con otras líneas tumorales de origen epitelial (276).

El anticuerpo monoclonal MINT-5 reconoce la molécula que actúa como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) que, en algunas líneas tumorales, presenta un nivel de expresión muy elevado (417).

En la tabla 2.5, quedan recogidos los porcentajes de reactividad de los anticuerpos monoclonales sobre carcinomas ováricos y carcinomas mamarios, así como otros tejidos tumorales. Todos ellos fueron probados sobre muestras de tejido no tumoral, en los que la reactividad resultó negativa o escasa.

La evaluación del número de receptores por célula y de la constante de afinidad entre los AcMos y sus antígenos correspondientes ha sido realizada previamente por distintos autores (289,416).

anticuerpo monoclonal	isotipo	célula diana	referencia
MBr 1	IgM	MCF 7	12,24,415
MOv 2	IgM	1063 CaOv	265,414
MLuC1	IgG2a	MCF 7 SW 626	266
MLuC2	IgG	HT-29	293
Mov 17	IgG1	OvCa 432 HT-29 MCF 7	293
Mov 18	IgG1	OvCa 432	276
Mov 19	IgG2a	OvCa 432	276
MINT-5	IgG1	A431	416

Tabla 2.3. Características de los anticuerpos monoclonales (1)

En la tabla se recogen algunas de las características de los anticuerpos monoclonales (AcMos) utilizados en esta tesis. En cada caso se indica el nombre de la línea tumoral humana que es reconocida por el AcMo como célula diana. Alguno de estos anticuerpos, tales como MLuC1 o Mov 17, son capaces de reconocer de forma específica más de una línea celular.

anticuerpo monoclonal	constante de afinidad (M ⁻¹)	número de sitios por célula	referencia
MBr 1	4.8x10 ⁻⁸	0.08x10 ⁶	12,24,415
Mov 17	0.8x10 ⁻⁸	0.8x10 ⁶	293
Mov 18	2.0x10 ⁻⁸	1.0x10 ⁶	276
Mov 19	1.8x10 ⁻⁸	1.5x10 ⁶	276
MINT-5	0.6x10 ⁻⁸	1.3x10 ⁶	416

Tabla 2.4. Características de los anticuerpos monoclonales (2)

En este caso, aparecen recogidos los valores de la constante de afinidad y del números de receptores por célula para cada uno de los AcMos, sobre las distintas líneas celulares diana. Estos valores han sido reportados previamente, tal y como se puede comprobar en las correspondientes referencias, indicadas en las tabla.

AcMo	reactividad con:			epítipo	ref.
	carcinoma mamario (%)	carcinoma ovárico (%)	otros (%)		
MBr 1	80	6	acinar pancreático ⁽¹⁾ (100) Leche materna	Hidrato de carbono en glucolípido GL6	12,24 415
MOv 2	14	80	suero de pacientes CaOv (87) antígeno Le ^a	Carbohidratos de mucinas, glucoproteínas y neutros	265
MLuCl	86	62	pulmón (84)	Hidrato de carbono de varias gluco- proteínas	265
MLuCl2	72	30	colon (60)	Glucoproteína 75.000 mw de la superficie celular en carcinoma de cólón	293
MOv 17	60	65	pulmón (70)		276
MOv 18	2	80	cistadenoma seroso ⁽²⁾ (100)	Tres epítipos diferentes de una glucoproteína de 38.000 mw	276
MOv 19	2	90	cistadenoma seroso ⁽²⁾ (100)		276
MINT-5	40	50	sobreexpresión de EGFr	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFr)	416

Tabla 2.5. Características de los anticuerpos monoclonales (y 3)

En la tabla se analizan los valores de reactividad con distintos carcinomas mamarios y ováricos, así como con otros tipos de tumores, obtenidos para los distintos anticuerpos monoclonales. Entre paréntesis se especifican los porcentajes de reactividad obtenidos por los distintos autores (ref.) sobre cada uno de los tumores estudiados. También se recogen en la tabla, los epítipos reconocidos por cada uno de ellos.

⁽¹⁾Tumor del componente exocrino del páncreas.

⁽²⁾Tumor ovárico

El antígeno Le^a es uno de los antígenos asociados a los grupos sanguíneos de Lewis. El peso molecular de los antígenos reconocidos se expresa como mw.

2.2. Cultivo de *Aspergillus*

2.2.1. Cultivo de *Aspergillus* en medios sólidos

2.2.1.1. Medios de cultivo

El cultivo del *Aspergillus* en medios sólidos, se llevó a cabo en placas de petri y en tubos de agar inclinado (TAIS), que contenían agar de Czapek-Dox (Adsa Micro, Madrid, España).

Este medio de cultivo es el recomendado por Raper y Fenell como medio sólido para el estudio comparativo entre las distintas especies del género (162). Su composición está tomada de la fórmula original de Czapek de 1902-1903, modificada por Dox en 1910 para las distintas especies de *Penicillium* y de *Aspergillus* (166-168) y es la siguiente, expresada en gramos de componente por litro de medio:

Sacarosa	30.00	g
Nitrato sódico (NaNO_3)	2.00	g
Glicerofosfato magnésico	0.50	g
Sulfato de potasio	0.35	g
Cloruro potásico	0.50	g
Sulfato ferroso	0.01	g
Agar-agar	15.00	g

Como puede observarse, la única fuente de nitrógeno en este medio son los nitratos.

Un segundo medio de cultivo utilizado fue el agar al extracto de Malta (Adsa Micro), en el que puede observarse una esporulación más abundante y más rápida de las colonias de *Aspergillus* (162). La composición de este medio de cultivo, expresada también en gramos de componente por litro de medio es la siguiente:

Extracto de Malta	13.0	g
Dextrina	2.5	g
Peptona de gelatina	5.0	g
Agar-agar	15.0	g

En este caso, la fuente de nitrógeno la constituye el extracto de Malta, obtenido a partir de la extracción de la fracción soluble de la cebada malteada, seguida de un proceso de desecación a baja temperatura para alterar lo menos posible su composición nitrogenada y su elevado contenido en azúcares, sobre todo maltosa (418).

2.2.1.2. Preparación de los medios de cultivo sólidos

Para la preparación de los medios, el agar de Czapek-Dox y el extracto al agar de Malta, se resuspendió a una concentración de 4.9% p/v y 3.6% p/v, respectivamente, en agua destilada por un sistema Milli-Q (Millipore, Co, Ashby Road, Bedford, MA, USA). Las suspensiones obtenidas fueron calentadas hasta ebullición, momento en que el agar se disuelve, tras lo cual las soluciones se esterilizaron por calor húmedo a 120 °C durante 15 minutos en

un esterilizador de AMSCO, General Purpose (USA).

Cuando estuvieron estériles y, antes de que el agar solidificara, se distribuyeron en tubos de 15 mm x 120 mm con tapón de rosca a razón de 5 ml por tubo, los cuales habían sido previamente esterilizados en iguales condiciones. Después, se pusieron los tapones, y las bocas de los tubos se apoyaron sobre una plataforma de 2 cm de altura, consiguiendo así que el agar gelificara de forma inclinada.

Los TAIS se dejaron secar durante 2 días, a temperatura ambiente con el tapón a medias de enroscar, para favorecer la evaporación del exceso de agua presente en la superficie del agar.

Las mismas soluciones de agar de Czapek-Dox al 4.9 % p/v y de agar al extracto de Malta al 3.6 % en agua destilada, se dispusieron en placas de cultivo de plástico de 9 cm de diámetro (Soria Greiner S.A., Madrid, España), a razón de, aproximadamente, 20 ml por placa. Las placas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el agar solidificó, momento en el que se pusieron boca abajo en una estufa a 30°C hasta que el agua de la superficie del agar se secó. Las placas que no eran utilizadas inmediatamente después de su preparación, se conservaban envueltas en papel de filtro a 4°C durante un tiempo máximo de 3 meses.

Cuando se estudió el crecimiento del hongo en distintas condiciones de pH y fuerza iónica, las placas y los TAIS se prepararon a partir de una solución de Czapek-Dox al 4.9% p/v, en agua destilada, que presenta un valor de pH de 6.8. Esta solución se trató de las siguientes maneras:

1. El agar de Czapek-Dox fue llevado a pH 8.25 con la adición de NaOH diluida.
2. El agar de Czapek-Dox fue llevado a pH 5.2 con la adición, gota a gota, de ácido clorhídrico (HCl) al 37% v/v.
3. A la solución de agar de Czapek-Dox se le añadió un 20% p/v de sacarosa (Merck). En este caso el pH final de la solución presentó un valor de 7.3.

2.2.1.3. Siembra de las placas de cultivo

Cuando los TAIS estuvieron secos, se sembraron con ayuda de una aguja de siembra a partir de placas de cultivo crecidas o de otros TAIS, distribuyendo el inóculo en zig-zag por la superficie del agar, tras lo cual se mantuvieron a temperatura ambiente en recipientes cerrados.

De igual manera, cuando las placas estaban secas, se sembraron en tres puntos a partir de TAIS crecidos durante 8 días en las condiciones descritas en el párrafo anterior, con ayuda de una aguja de siembra y de un papel milimetrado en el que previamente se había dibujado el contorno de la placa y las posiciones de los tres puntos de siembra.

En otras ocasiones, las placas fueron sembradas con alicuotas obtenidas a partir de los medios de cultivo líquidos. En este caso, se tomaron 0.2 ml del medio con ayuda de una pipeta de plástico en condiciones estériles. La muestra se situó en la placa y se extendió homogéneamente con ayuda de una varilla de vidrio, dispuesta a modo de rastrillo.

Tras la siembra, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente en atmósfera saturada de vapor de agua. Estos cultivos permitieron estudiar las características de las colonias del hongo y las posibles contaminaciones.

2.2.2. Cultivo de *Aspergillus* en medio líquido

2.2.2.1. Preparación de los medios de cultivo

El cultivo de *Aspergillus* en medio líquido se llevó a cabo en matraces erlenmeyer en medio de la siguiente composición: 2% p/v de almidón de maíz ("corn starch" de Sigma, CA, USA), 1% p/v de peptona tripsica de caseína (Adsa Micro, Madrid, España), 1.5% p/v de extracto de carne (Adsa Micro) y 0.5% p/v de cloruro sódico (Carlo Erba, Milán, Italia) y 1% v/v de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua destilada. Normalmente se prepararon 4.5 litros por cultivo de dicho medio.

Una vez disueltos los componentes, los medios de cultivo así como los recipientes, se esterilizaron con vapor húmedo en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

2.2.2.2. Siembra de los medios de cultivo líquidos

Los medios de cultivo de cuatro litros y medio, se sembraron utilizando preinóculos de distinta procedencia:

1. En determinadas ocasiones, el medio se sembró a partir de 250 ml de un cultivo del hongo en medio líquido de igual composición, crecido durante 3 días a temperatura ambiente. Estos preinóculos a su vez, habían sido sembrados a partir de TAIS crecidos durante 8 días, sin aireación y a temperatura ambiente (23°C \pm 1°C).

2. En otras ocasiones, cuando se controló el número de esporas de *Aspergillus* sembrada por mililitro de medio de cultivo, el preinóculo se obtuvo a partir de placas del hongo crecidas, en donde las esporas se recogieron con ayuda de un asa de siembra, repitiendo la operación al menos 20 veces. Las esporas recogidas se añadieron a 4 ml de agua estéril y se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer. En este caso, se sembraron aproximadamente 25 esporas por mililitro de medio de cultivo.

Tras la siembra, en ambos casos, los cultivos de 4.5 litros fueron mantenidos a temperatura ambiente, sin agitación ni iluminación adicional, durante 13 días.

2.2.3. Inactivación del micelio de *Aspergillus*

Cuando los cultivos se dieron por finalizados, las placas y los TAIS, fueron tratados con una solución de formaldehído al 5% v/v (Quimipur, Madrid, España), en agua destilada, que se mantuvo durante 24 horas.

Los medios de cultivo líquido se trataron con una solución final de mertiolato o timerosal (Merck) de 0.01%, mantenida durante 2 horas, antes del procesamiento del medio.

En los experimentos de determinación de las condiciones de producción de α -sarcina por distintos medios de cultivo (ver apartado 2.2.6.), a los medios se les añadió azida sódica a una concentración final del 0.01% p/v (Merck) que se dejó actuar durante 24 horas.

2.2.4. Conservación de las cepas de *Aspergillus*

2.2.4.1. Mantenimiento de las cepas

Los hongos se mantuvieron en tubos de agar inclinado (TAIS) con 5 ml de agar de Czapek-Dox, preparados tal y como ha sido descrito en el apartado 2.2.1.2. Una vez cada 20 días se realizaron subcultivos del hongo en TAIS, sembrados a partir de otros crecidos en las condiciones descritas.

2.2.4.2. Conservación en tierra

Por otro lado, las cepas de *Aspergillus* han sido mantenidas en tierra durante períodos de tiempo largos. Este procedimiento de conservación está basado en el método descrito por Green y Fred en 1934, y también queda recogido en el libro "The genus *Aspergillus*" (162).

Para ello, se utilizó tierra de jardinería, indicada para plantas de interior con un buen contenido en turba y gran cantidad de materia orgánica. Esta se cernió a través de un colador metálico con un paso de aproximadamente 1 mm, con el fin de eliminar fragmentos gruesos que dificultan la siembra.

Posteriormente, se le añadió un 20% v/p de sacarosa (Merck) de una solución al 0.5% p/v en agua destilada y se dejó reposar al menos durante tres días. Transcurrido dicho tiempo, la tierra se esterilizó a 120°C durante 30 minutos por calor húmedo en autoclave. Esta esterilización se repitió tres veces con un intervalos de dos días, como mínimo, entre cada vez.

Después de la última esterilización, se mantuvo durante 4 horas en una estufa a 120°C aproximadamente, con el fin de eliminar prácticamente la totalidad del agua por evaporación.

Se dejó enfriar y se distribuyó en tubos de vidrio de 15 mm x 120 mm con tosca, iguales a los utilizados para los TAIS, a razón de 12 gramos por tubo. Estos tubos se esterilizaron nuevamente, esta vez a 180°C durante 30 minutos, por calor seco,

tras lo cual se comprobó la esterilidad de la tierra espolvoreando una muestra de la misma en placas de agar malta, que se cultivaron durante 1 semana a temperatura ambiente.

Una vez comprobada su esterilidad, a cada tubo se le añadieron 3.5 ml de una solución 0.15 M NaCl estéril en la que se habían añadido esporas del hongo a razón de 100.000 esporas por ml, de manera que la proporción de esporas final fuese de aproximadamente 30 esporas por mg de tierra. Los tubos se mantuvieron durante 1 semana a temperatura ambiente, con el fin de promover la evaporación del excedente de agua. Los tubos preparados de esta forma se conservan indefinidamente, mientras que estén bien cerrados, en la cámara fría entre 0° C y 4°C.

2.2.5. Cultivo de *Aspergillus giganteus* MDH 18894

La cepa MDH 18894 de *Aspergillus giganteus* fue cultivada en placas de agar de Czapek-Dox y en TAIS con igual medio de cultivo, tal y como ha sido descrito anteriormente en el apartado 2.2.1.

En los primeros cultivos en medio líquido se utilizó el medio de cultivo descrito por Olson (40,41), en el protocolo original de producción de la α -sarcina, preparado según se ha descrito en el apartado 2.2.2.1.

2.2.6. Variación de la composición y de las condiciones de cultivo

Para estudiar la producción de α -sarcina por el *A. giganteus* MDH 18894, se utilizaron distintos medios cuya composición se recoge en la tabla 2.6. Los cultivos se realizaron en distintas condiciones, que fueron las siguientes:

1. A temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
2. A una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, que fue mantenida con ayuda de una placa de aluminio conectada a una resistencia y a un termostato.
3. Con agitación ocasional del medio de cultivo en un agitator a intervalos de diez horas; y, por último
4. En condiciones de deficiencia de O_2 , para lo cual, tras la siembra, los tubos se taparon con un tapón de goma que se mantuvo durante todo el cultivo.

2.2.6.1. Composición de los nuevos medios de cultivo líquido

Como puede observarse en la tabla 2.6., en la composición de los medios de cultivo se variaron las fuentes de carbono y de nitrógeno utilizados hasta el momento, de manera que los productos elegidos fueron los siguientes: como extracto de carne se utilizó Bovril, fabricado por CPC (United Kingdom, Ltd. Esher, Inglaterra) y comercializado en nuestro país por Interfood España, S.A. (Madrid, España) y, como fuente de almidón de maíz

componentes del medio (g/100ml)						
medio	extracto de carne	Bovril	Corn Starch	Maizena	peptona	NaCl
1	1.5		2.0		1.5	0.5
2	1.5			2.0	1.5	0.5
3		1.5		2.0	1.5	0.5
4		1.5		2.0		0.5
5		1.5		2.0		
6	1.5		1.0		1.0	0.5

Tabla 2.6. Composición de los medios de cultivo líquido utilizados para *Aspergillus giganteus* MDH 18894
 En la tabla se recoge la composición de los medios de cultivo líquidos utilizados en el cultivo de *Aspergillus giganteus* MDH 18894. Los medios han sido designados por números y cada uno de los componentes se expresa en gramos por cada 100 de medio de cultivo. La procedencia de dichos componentes y el procedimiento de preparación de los medios, se describe en el apartado 2.2.6. El Corn Starch es un almidón de maíz obtenido de Sigma.

se utilizó la Maizena, harina compuesta mayoritariamente por almidón de maíz, elaborado por CPC España S.A. (Barcelona, España).

2.2.6.2. Preparación de los nuevos medios de cultivo líquido

La preparación de estos de cultivo fue diferente en función de la fuente de carbono utilizada. Así los medios que contenían Corn Starch (medios 1 y 6), se prepararon según ha sido descrito anteriormente (ver apartado 2.2.2.1.).

En los medios que contenían Maizena (medios 2.3.4.5), ésta fue previamente hidrolizada, para aumentar la solubilidad del almidón de maíz y favorecer su utilización por parte del hongo. La hidrólisis se realizó de la siguiente forma: a una suspensión de Maizena en agua destilada se le añadió HCl puro (Merck) hasta una concentración de 3.5 mM por gramo. Se calentó hasta ebullición y se mantuvo en este estado hasta que la solución se hizo más transparente, cosa que sucede aproximadamente a las dos horas de iniciado el proceso.

Transcurrido dicho tiempo, la solución de Maizena hidrolizada se neutralizó con la adición de NaOH en lentejas (Carlo Erba), hasta observar un cambio en la coloración y aspecto de la solución, que vira de blanco opaco a amarillo transparente cuando se llega a la neutralización.

Los medios de cultivo se completaron mediante la adición de los demás componentes, según cada caso. A continuación, el pH se ajustó a 8.0 con la adición de NaOH.

Una vez preparados, se distribuyeron en tubos de vidrio de 30 ml, a razón de 10 ml por tubo y de 14 tubos por cada uno de los medios y condiciones de cultivo, hasta un total de 56 tubos por medio de cultivo. Estos tubos se esterilizaron en autoclave a 120°C, durante 20 minutos, y el volumen de agua que perdieron durante el proceso se completó con agua destilada esterilizada en las mismas condiciones.

Los tubos se sembraron poniendo un asa de siembra de un cultivo de tres días de *A. giganteus* MDH 18894, crecido en el medio líquido descrito en el apartado anterior, y que se consideró como medio de referencia (40,41).

A los 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 días, en los cultivos correspondientes, se añadió azida sódica a una concentración final de 0.1% p/v (Merck), que se dejó actuar durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, los medios se centrifugaron a 27.000 g, durante 20 minutos y en el sobrenadante de cada uno de ellos se determinó la densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro (ver apartado 2.3.1.1.), la fuerza iónica y el pH, el contenido en hexosas según el método de Dubois (426) (ver apartado 2.3.6) y la cantidad de α -sarcina determinada por radioinmunoensayo (ver apartado 2.8.2.1.).

2.2.7. Aislamiento de las distintas estructuras de *Aspergillus giganteus* MDH 18894

2.2.7.1. Obtención de una fracción enriquecida en hifas

Una fracción que contenía solo las hifas de *A. giganteus* MDH 18894, fue obtenida a partir de un cultivo de 24 horas del hongo, crecido en medio de cultivo líquido sin agitación, sin aireación adicional y a temperatura ambiente.

El cultivo fue centrifugado a 27.000 g, durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada de Dupont Instrument-Sorvall (Newtown, Connecticut, USA), modelo RC-5, con un rotor SS-34, y se recogió el sobrenadante en donde se encontraba el micelio del hongo. Este se dejó crecer durante otras 24 horas. Al cabo de dicho tiempo, se centrifugó nuevamente a 27.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante de esta segunda centrifugación se observó al microscópio, comprobándose que sólo contenía hifas.

2.2.7.2. Obtención de una fracción enriquecida en conidióforos libres de esporas.

La fracción enriquecida en conidióforos fueron obtenidas a partir de los conidióforos maduros del cultivo líquido de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, crecido durante 1 mes, sin agitación, sin aireación suplementaria, sin iluminación controlada y a temperatura ambiente, en el cual se recortaron los conidióforos desarrollados en la superficie del cultivo con ayuda de unas tijeras y se recogieron sobre una solución de sacarosa 20% p/v. La suspensión se agitó energicamente para disgregar los conidióforos, se cargó sobre una solución de sacarosa al 60% p/v y se centrifugó a 4.300 g durante 30 minutos a 4°C, en una centrífuga Sorvall.

Finalizada la centrifugación, en el fondo del tubo pudo observarse un sedimento marrón y, por encima del sedimento, un acúmulo de material filiforme. Este material filiforme fue recogido separadamente con ayuda de una pipeta Pasteur, fue diluido en una solución de sacarosa 0.32 M y centrifugado a 27.000 g durante 10 minutos a 4°C.

En esta segunda centrifugación pudo observarse nuevamente, en el fondo del tubo, el material filiforme libre de sedimento marrón que, cuando se observó al microscópio representa una fracción de conidióforos prácticamente libres de esporas.

2.2.7.3. Obtención de una fracción enriquecida en esporas

Parte de la suspensión de los conidióforos maduros del cultivo de *A. giganteus* MDH 18894 (ver apartado anterior), se cargó sobre una solución de sacarosa 0.32 M. La suspensión fue sometida a sonicación durante 5 minutos con pulsos de 30 segundos a intensidad indeterminada, con el fin de disgregar el micelio y se centrifugó a 30 g para eliminar los fragmentos no homogeneizados con la sonicación.

El sobrenadante obtenido de la centrifugación, se cargó

sobre un gradiente de sacarosa entre el 20% p/v y el 50% p/v en agua destilada y se centrifugó en una centrífuga Sorvall, durante 1 hora a 1.100 g.

Las fases obtenidas en la centrifugación, se separaron y se analizaron al microscopio. Así, pudo observarse que la interfase entre 50% p/v y de 20% p/v de sacarosa estaba enriquecida en esporas.

Cada una de las tres fracciones obtenidas, enriquecidas en hifas, conidióforos y esporas, se sembró en 1 litro de medio de cultivo líquido y se creció a temperatura ambiente durante 24 horas. Al cabo de las 24 horas, se tomaron muestras de los medios de cultivo, en las que se determinó la cantidad de α -sarcina por radioinmunoensayo, según se describe en el apartado 2.8.2.1.

Las fotografías, realizadas al microscopio óptico de cada una de las fracciones, aparecen recogidas en la figura 3.19. junto con las concentraciones de proteína obtenidas.

2.3. Técnicas de determinación de proteínas

2.3.1. Cálculo de la concentración de proteínas presentes en las distintas soluciones

2.3.1.1. Determinación de la absorbancia de las soluciones a 280 nm

El cálculo de la concentración de proteínas presente en cada muestra, se hizo a partir de los valores de densidad óptica a 280 nm, obtenidos en un espectrofotómetro de haz sencillo modelo DU6 de Beckman (Beckman Instrument, Inc. Palo Alto, California, USA) y de los correspondientes coeficientes de absorción de proteínas puras en solución. Las soluciones fueron diluidas convenientemente para que el valor de absorbancia a 280 nm fuera menor de 1.5, utilizando como cero de absorción agua destilada o una muestra del tampón en el que estaban disueltas las proteínas.

En todos los casos, a las lecturas de densidad óptica a 280 nm, se les aplicó la ley de Lamber-Beer (419), que permite determinar la concentración de proteínas de una solución, conociendo el coeficiente de extinción de las proteínas incluidas en la misma y el paso óptico de la cubeta utilizada.

Los coeficientes de absorción utilizados E 0.1%, 280nm, 1cm fueron los siguientes: 1.34 para α -sarcina y restrictocina, 1.35 para mitogillina, calculados por Gavilanes y col (196), 1.18 para la ricina según Thorpe y Ross (420) y 1.35 para la IgG de conejo según Johnstone y Thorpe (419,421).

2.3.1.2. Otras técnicas

Para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras han sido utilizadas también las técnicas de inmunodifusión radial simple o Mancini (422) y el método de Lowry (423).

La técnica de inmunodifusión radial simple ha sido utilizada en la determinación de la concentración de α -sarcina en los medios de cultivo y en las fracciones de los distintos pasos de purificación de la proteína. El procedimiento y la obtención de la recta patrón se describen en el apartado 2.5.3.2. y 2.5.3.3.

El método de Lowry ha sido utilizado así mismo en la determinación de las concentraciones de proteína de las distintas muestras, siguiendo el procedimiento original del autor y una modificación del mismo debida a Peterson (419,423). Para llevar a cabo la valoración de las soluciones, se hizo una recta patrón que queda recogida en la figura 2.4., en la que se utilizaron distintas diluciones de suero de conejo, para el que se estimó una concentración de proteínas total de 80 mg/ml (424).

2.3.2. Concentración de soluciones de proteína por ultrafiltración

La concentración de las soluciones de proteínas se realizó empleando membranas Diaflo PM10 e YM2 (Amicon, Lexington, MA, USA), de diámetros 62 mm y 75 mm, que son permeables a compuestos de pesos moleculares inferiores a 10.000 y a 1.000, respectivamente. Estas membranas se dispusieron en células de ultrafiltración de Amicon de 450 ml y 200 ml de volumen.

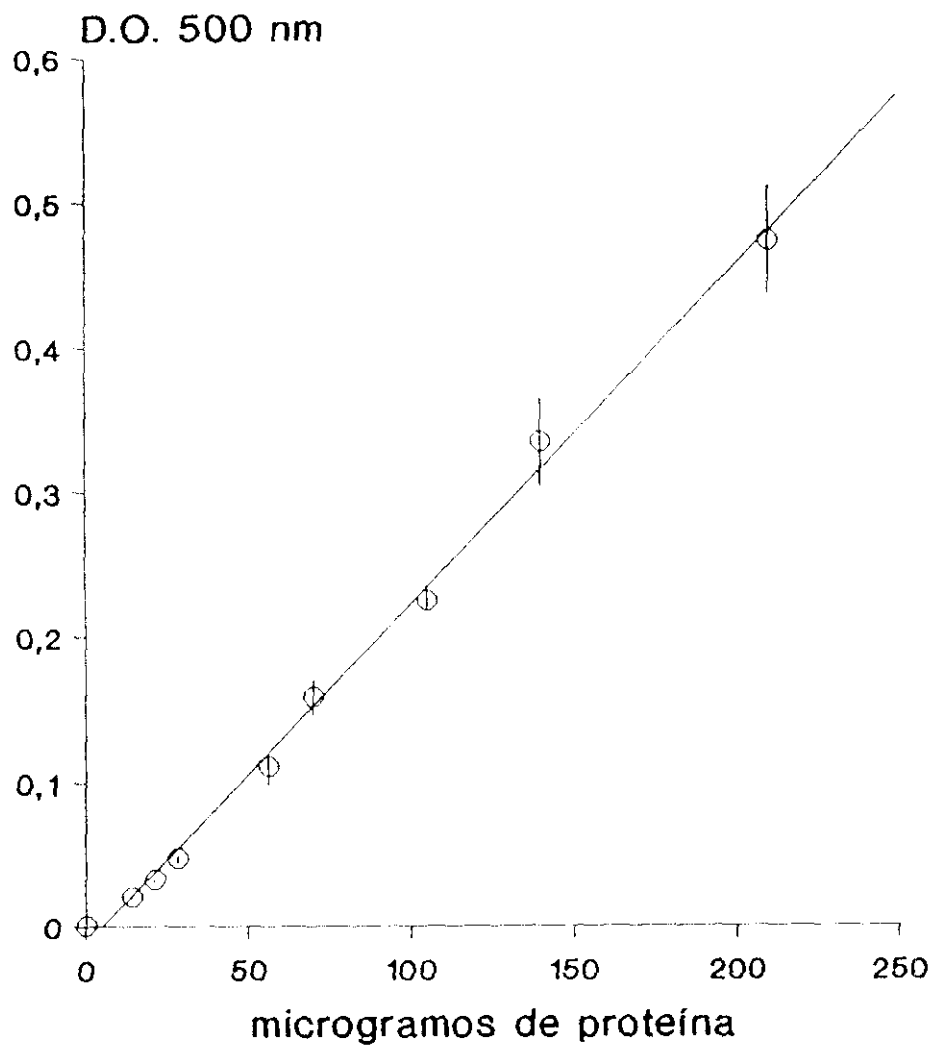
Las concentraciones se efectuaron a 4°C hasta llevar la muestra al volumen deseado, bajo atmósfera de nitrógeno, a una presión de entre 2 bar y 3 bar. Después de acabada la concentración, se recogieron las muestras concentradas y se conservaron las membranas a 4°C, con agua destilada y 0.1% p/v de azida sódica.

2.3.3. Diálisis de soluciones de proteína

La diálisis se llevó a cabo en tubos de celulosa (Union Carbide Corporation, Chicago, IL, USA, distribuidas por Serva o por Sigma). Los tubos fueron hidratados en agua destilada mantenida en ebullición durante 5 minutos, para eliminar la glicerina y otros compuestos conservantes que llevan adheridas, eliminando así su influencia en la absorción de la muestra a 280 nm.

Tras la ebullición, se anudó uno de los extremos del tubo y se comprobó que éste no presentaba perforaciones y, a continuación, se introdujo la muestra anudándose el otro extremo tras eliminar el aire del interior del tubo.

Una vez cerrado, el tubo se dispuso en una probeta de vidrio que contenía el tampón de diálisis, y fue mantenido en flotación, con agitación magnética, durante al menos 4 horas. En todos los casos, las muestras se dializaron contra 60 a 100 volúmenes de tampón. Finalizado este tiempo, se extrajo la muestra del tubo de diálisis.



$$y = 0.002359x - 0.015424$$

$$r^2 = 0.996386$$

para $n = 8$

x = densidad óptica a 500 nm

y = μg de proteína/pocillo

Figura 2.4. Recta patrón de determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

La recta patrón ha sido obtenida a partir de los valores de absorción a 500 nm de distintas diluciones de plasma de conejo con concentraciones de proteína comprendidas entre 0 y 250 μg , tratadas según el método colorimétrico descrito por Lowry y col (423). El procedimiento aparece descrito en el apartado 2.3.1.2. En la figura también se indica la fórmula de la recta obtenida.

2.3.4. Precipitación con sulfato amónico ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$)

Como método de concentración de las proteínas presentes en los extractos de los distintos materiales biológicos y como primer paso de purificación de las toxinas, se procedió a la precipitación con sulfato amónico al 80%. En la purificación de los anticuerpos monoclonales, se utilizó una concentración del 45% (ver apartado 2.5.2.3.).

Para ello, se añadieron a los extractos la cantidad de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (Carlo Erba), que permite alcanzar dicha concentración final. El cálculo la cantidad de sulfato amónico se llevó a cabo siguiendo las indicaciones hechas por Colowick y Kaplan (425). La solución resultante se mantuvo con agitación magnética durante 60 minutos y se centrifugó a 25.500 g, durante 20 minutos a 25°C en una centrífuga Sorvall y con un rotor GSA. El precipitado fue resuspendido en volumen mínimo con agua destilada.

Tras la resuspensión, el material era dializado para eliminar el exceso de sales.

2.3.5. Liofilización de las soluciones de proteína

La liofilización de las distintas soluciones de proteínas se llevó a cabo en un liofilizador marca Virtis, modelo 10-030 (The Virtis Company, Inc. Gardiner, N.Y., USA).

Previamente, las muestras fueron colocadas en recipientes de cristal de 150 ml y 50 ml de capacidad (Labconco o Afora, Madrid, España), y congeladas en acetona (Doesder, Montplet & Esteban, S.A. Barcelona, España) saturada de nieve carbónica. La congelación se llevó a cabo inclinando el recipiente de cristal para conseguir que la muestra ocupase la mayor superficie posible.

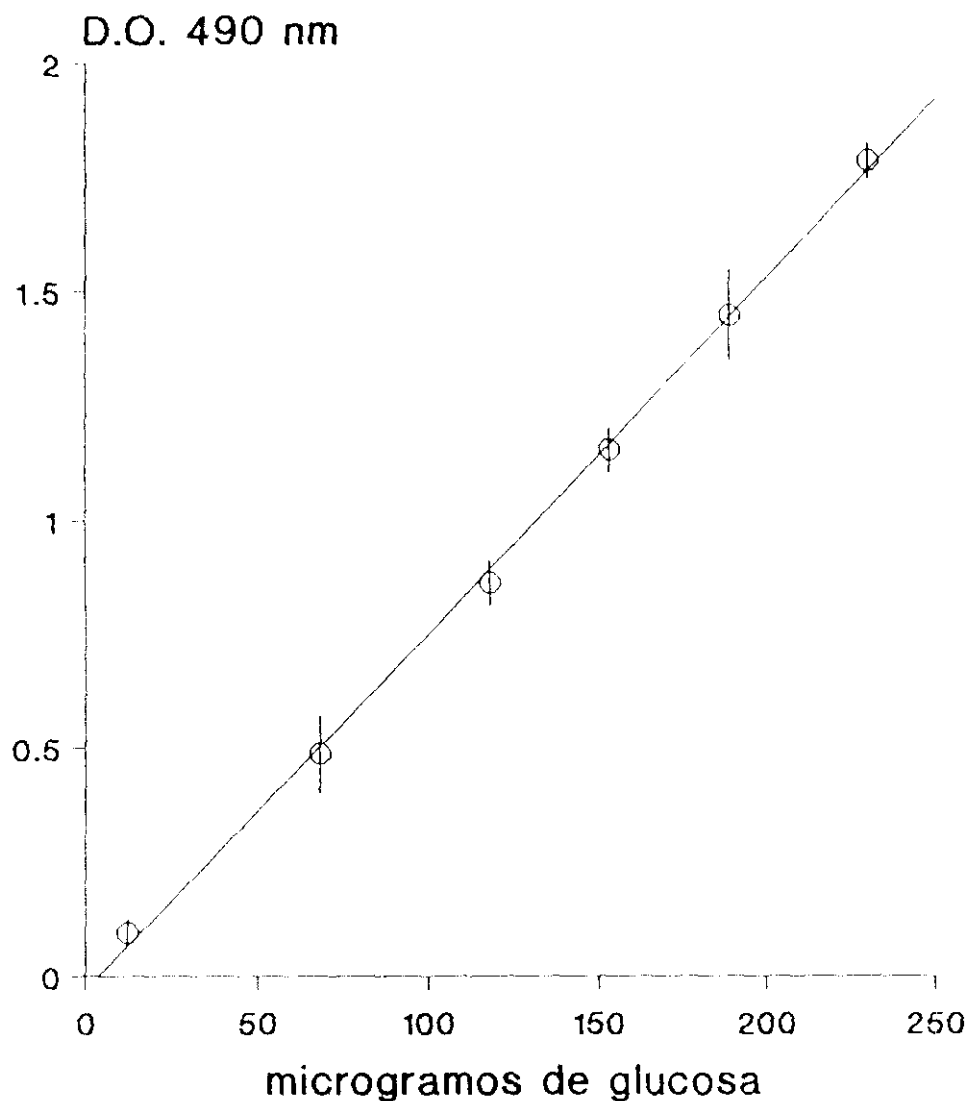
Cuando ésta estuvo congelada, el recipiente se ajustó a una de las tomas del liofilizador, que estaba a una temperatura entre -50°C y -60°C y a una presión entre 30 milibar y 60 milibar.

2.3.6. Determinación de la concentración de hexosas

La determinación de hexosas en las muestras de los medios de cultivo y en las soluciones de proteína, se llevó a cabo por la técnica del fenol-sulfúrico, descrita por Dubois y col (426).

Esta técnica se realizó en tubos de vidrio de 30 ml, que fueron lavados previamente con ácido sulfúrico diluido 1:2 en agua destilada, después sólo con agua y que se dejaron secar hasta su uso.

A una alícuota de 100 µl de la muestra que se quiere analizar, se añadieron 50 µl de una solución de fenol al 80% p/v (Merck) en agua destilada y a continuación 5 ml de ácido sulfúrico concentrado analítico (Merck). Los tubos se dejaron enfriar y después de una hora se leyó la absorción de las muestras a 490 nm en un espectrofotómetro DU6 (Beckman). El color es estable al menos durante 48 horas.



$$y = 0.007767x - 0.027550$$

$$r^2 = 0.998688$$

para $n = 6$
 $x = \mu\text{g de glucosa / pocillo}$
 $y = \text{densidad óptica a 490 nm}$

Figura 2.5. Recta patrón de determinación de la concentración de hexosas en los medios de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

En la gráfica se representan los valores de densidad óptica a 490 nm obtenidos para cada una de las concentraciones de glucosa utilizada, en un rango comprendido entre 10 μg y 230 μg . La determinación ha sido hecha por el método de Dubois y col (426), según se describe en el apartado 2.3.6. Esta recta ha sido utilizada como recta patrón para la determinación de las concentraciones de hexosas detectadas a lo largo de los distintos días de cultivo.

La concentración de hexosas se determinó como equivalentes de glucosa a partir de una recta patrón obtenida por el mismo método con cantidades de glucosa entre 10 µg y 230 µg, según se recoge en la figura 2.5.

2.3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS)

2.3.7.1. Preparación y desarrollo de los geles en sistema vertical

Las electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida se llevaron a cabo en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) de acuerdo con el método descrito por Laemmli (427). En la mayoría de los casos, se utilizaron geles de separación que contenía entre un 10% p/v y un 15% p/v de una solución de acrilamida más bisacrilamida 35% T, en tampón 0.375 M Tris-HCl, pH 8.3 y un gel de concentración que contenía entre 5% p/v y un 7% p/v de la misma solución de acrilamida-bisacrilamida en tampón 0.125 M Tris (Tris (hidroximetil) amino metano)-HCl, pH 6.8. A ambos tampones se les añadió una concentración final de 0.1% p/v de SDS (Sigma). Como tampón de electroforesis se utilizó 0.025 M Tris 0.192 M glicocola, pH 8.3 con un 0.1% p/v de SDS.

Las muestras, generalmente con una cantidad de proteína comprendida entre 10 µg y 40 µg, se prepararon añadiendo tampón 0.0625 M Tris-HCl pH 6.9, con 1% p/v de SDS, 10% v/v de glicerol (Merck) y azul de bromofenol (Merck) a una concentración de 0.06 mg/ml, y se calentaron durante 5 minutos en un baño con agua hirviendo.

Cuando las proteínas fueron estudiadas bajo condiciones reductoras, se añadió a las mismas un 5% v/v de 2-β-mercaptoetanol. En los geles realizados durante el proceso de purificación de la briodina, se añadió tanto en la preparación de los geles como de las muestras una concentración de 6 M urea (Merck).

Como marcadores de peso molecular fueron utilizadas las siguientes proteínas: conalbúmina tipo I (86.000), albúmina de suero bovino (68.000), catalasa de hígado bovino (58.000), peroxidasa de rábano picante (40.000), anhidrasa carbónica (29.900), inhibidor de la tripsina de soja (21.000) y lisozima (14.000) obtenidos de Sigma. También fueron utilizados los patrones de peso molecular de BIO-RAD compuestos por miosina (200.000), β-galactosidasa (116.000), fosforilasa B (94.000), albúmina de suero bovino (68.000) y ovoalbúmina (43.000), y de Boehringer Manneheim, GmbH (Alemania) compuestos por fosforilasa (97.000), glutamato deshidrogenasa (55.400), lactato deshidrogenasa (36.500) e inhibidor de la tripsina de soja (20.100).

La electroforesis se desarrolló en una cámara de electroforesis vertical similar a la descrita por Studier (428), aplicando un campo constante de 80 V hasta que el marcador de azul de bromofenol se introduce en el gel de separación, elevando entonces el voltaje hasta valores comprendidos entre 120 V y 180 V. La electroforesis se dió por finalizada cuando el frente de color azul del gel llegaba a un centímetro por encima del final del gel.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñieron con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.25% p/v en metanol:ácido acético:agua en proporciones 45:10:45 (429) eliminando el exceso de colorante en el mismo disolvente.

2.3.7.2. Secado de los geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida-SDS fueron secados de acuerdo con el método descrito por Wallevik y Jensenius (430). Tras decolorar el gel hasta conseguir el contraste deseado, este se colocó entre dos pliegos de papel de celofán humedecidos en una solución de glicerol:metanol:ácido acético:agua (5:40:5:50) y sujetos mediante dos bastidores de metacrilato de dimensiones 18.5 cm de lado interno y 21.5 cm de lado externo, con un grosor de 0.5 cm, unidos con pinzas.

El soporte se mantuvo durante toda la noche a temperatura ambiente hasta que el gel se secó por completo. Finalizado el proceso, se desmontó el bastidor y los bordes del gel se sellaron con papel adhesivo.

2.3.7.3. Geles de poliacrilamida en el sistema automático "Phastsystem"

En determinados experimentos, las distintas fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida en presencia SDS en gradiente del 4% al 15%, obtenidos de Pharmacia (Phastgel gradient 4-15, Pharmacia, Piscataway, New Jersey, USA) que se desarrollaron utilizando el sistema automático "Phastsystem" de la misma casa comercial y en las condiciones indicadas por el fabricante.

2.4. Técnicas cromatográficas

2.4.1. Activación de las resinas de intercambio iónico

Las resinas de intercambio iónico, DE 23 cellulose (Whatman International Ltd., Maidstone Kent, Inglaterra) un intercambiador aniónico, cuyos radicales activos cargados son restos de dietil-aminoetano unidos a una matriz de celulosa, y CM 23 cellulose (Whatman), un intercambiador catiónico, cuyos restos activos son carboximetano, unidos también a una matriz de celulosa, necesitaron de una activación previa para que los radicales unidos a la matriz, adquieran su carga característica y puedan llevar a cabo su función de intercambiadores de iones.

El proceso de activación se inició añadiendo la resina sólida en 15 volúmenes de una solución de 0.5 M HCl. La suspensión se agitó con una varilla de vidrio hasta conseguir que la resina se empapara completamente en la solución de HCl, en la que se mantuvo durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se lavó 15 veces con igual número de volúmenes de agua destilada, hasta conseguir que el valor de

pH se situase en el rango entre 4 y 5. Para lavar la resina de forma conveniente se utilizó un embudo Buchner conectado a una toma de vacío y se aspiró el exceso de agua.

En este momento, a la resina se le añadieron 15 volúmenes de una solución de 0.5 M NaOH en la que, tras conseguir que se empapara bien, se mantuvo durante 20 minutos al cabo de los cuales se lavó 15 veces con agua destilada hasta que el valor de pH de la suspensión fue inferior a 8. Nuevamente se eliminó el exceso de agua con ayuda de un embudo Buchner conectado al vacío.

Tras este tratamiento, la resina fue degasificada al vacío y equilibrada en el tampón de cromatografía correspondiente. Cuando se utilizó para la purificación de la α -sarcina (ver apartado 2.6.1.), se equilibró en tampón 0.025 M ácido acético/acetato sódico pH 4.5, (AcH/AcNa) para lo cual se utilizó, en primer lugar, un tampón 0.25 M AcH/AcNa a igual pH, del que fueron necesarios 2 volúmenes de columna para alcanzar el valor de pH deseado. Una vez que el valor de pH era estable, se pasaron 3 volúmenes del mismo tampón a una concentración 0.025 M con lo cual se consiguió estabilizar, así mismo, el valor de fuerza iónica.

2.4.2. Activación de la resina Sepharose CL-4B con ácido clorhídrico (HCl)

Uno de los métodos utilizados para la purificación de la ricina a partir del extracto de semillas de *Ricinus communis* L. ha sido la cromatografía de afinidad en resinas compuesta por restos de hidratos de carbono, en particular de galactosa, como es el caso de la Sepharose CL-4B (Pharmacia, S.A., Uppsala, Suecia) (413). Para aumentar el rendimiento de purificación de la ricina, se procedió a la activación de la resina por medio de la hidrólisis con 0.2 M HCl, obteniendo así un mayor número de restos de azúcares accesibles que pueden fijar la proteína (431).

En primer lugar, se procedió al lavado de la resina con 30 volúmenes de agua destilada para eliminar las sustancias conservantes.

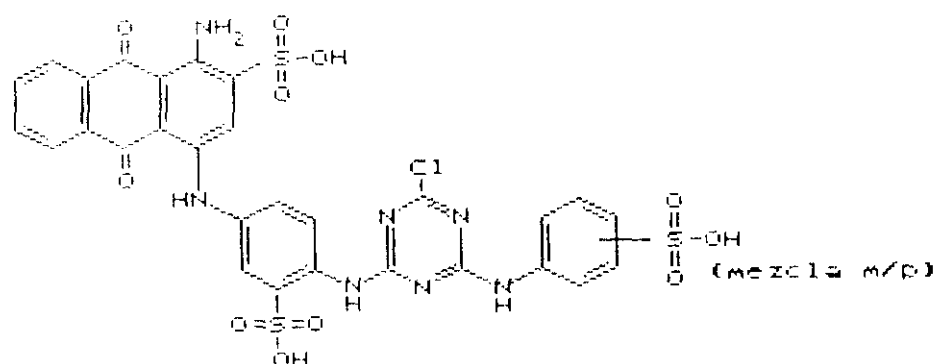
Una vez lavada exhaustivamente, se mezcló con dos volúmenes de 0.2 M HCl. La mezcla se calentó en un baño termostatzado a 50°C durante 3 horas, con agitación ocasional y, transcurrido dicho tiempo, se lavó con agua destilada nuevamente con el fin de eliminar el exceso de ácido clorhídrico.

Tras este segundo lavado, la resina se mantuvo durante una hora a 37°C con tampón 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, utilizándose en la purificación de la ricina (apartado 2.6.2.).

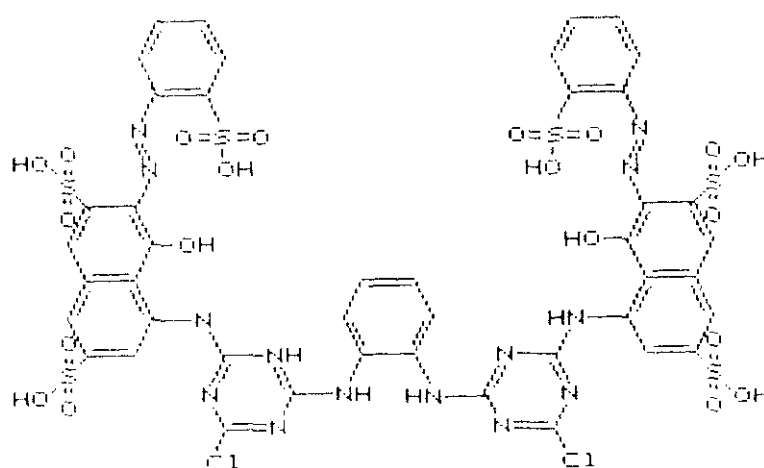
2.4.3. Unión de los colorantes triazínicos a Sepharose CL-4B

2.4.3.1. Reacción entre los colorantes triazínicos y la Sepharose CL-4B

Esta técnica está basada en el método descrito por Dean y



Cibacron Blue F3GA



Procion Red HE3B

Figura 2.6. Colorantes triazínicos

En la figura aparecen representadas las fórmulas de los colorantes triazínicos Cibacron Blue F3GA y Procion Red HE3B, que fueron inmovilizados en Sepharosa CL-4B, según se describe en el apartado 2.4.3. Las fórmulas han sido tomadas de Dean y Watson (433) y, como se especifica en la figura, el el grupo SO_2H del Cibacron Blue F3GA, puede encontrarse en la posición -meta o -para del anillo bencénico.

Watson (432). En ella, los colorantes triazínicos se unen covalentemente a una resina, en condiciones de pH básico y con una alta concentración de sales (432). En este caso se utilizó como matriz, la resina Sepharose CL-4B (Pharmacia), a la que se unieron los colorantes Cibacron Blue F3GA (Reactive Blue 2 de Sigma) y Proción Red HE 3B (Proción Brillant Rot MX-2B de Serva), cuya estructura se recoge en la figura 2.6. Las resinas derivadas de la conjugación fueron denominadas Blue-Sepharose y Red-Sepharose, respectivamente, y se consideró que los colorantes quedaban inmovilizados por la matriz (432).

Para llevar a cabo la síntesis de estas resinas, se partió en cada caso, de 50 gramos de Sepharose CL-4B, hidratados en 125 ml de agua destilada durante 2 horas. Tras la hidratación, la resina se lavó repetidamente con agua destilada en un embudo Buckner, aspirando el exceso de líquido por medio de una bomba de vacío.

Una vez lavada, se añadieron 1.25 gramos de colorante disueltos en 125 ml de agua destilada y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Después se añadió NaCl (Carlo Erba) hasta una concentración final del 20% p/v, y tras agitar durante media hora, la mezcla de reacción se completó con la adición de carbonato sódico ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$), a una concentración final de 0.2 M.

La reacción se desarrolló durante 40 horas a 45°C en un baño termostatzado y con agitación ocasional. Transcurrido dicho tiempo, la resina se colocó de nuevo en un embudo Buckner y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

Cuando dejó de eluir colorante, la resina se lavó en primer lugar con 50 volúmenes de una solución 1 M de KCl (Merck), y a continuación con 50 volúmenes de una solución 4 M urea, en la que se conservó durante toda la noche. Al día siguiente, se lavó nuevamente con agua destilada y se mantuvo en tampón 0.02 M fosfato sódico pH 7.6, 0.14 M NaCl.

2.4.3.2. Cálculo de la cantidad de colorante fijado a la resina

Este cálculo se realizó por espectrofotometría de absorción, considerando para el Cibacron Blue F3GA un peso molecular de 841.7 y un coeficiente de absorción ϵ a 603 nm de 17.373, mientras que para el Proción Red se consideró como peso molecular 717.4 y como ϵ a 510 nm un valor de 21.292.

En primer lugar, se compararon los coeficientes de hidratación de la Sepharose CL-4B, antes y después de la conjugación con los colorantes, de donde se obtuvo que porcentaje de dicho coeficiente en Blue-Sepharose y Red-Sepharose correspondía al colorante unida a la resina.

Después se leyó la absorción de las resinas Sepharose CL-4B y Blue-Sepharose a 603 nm y Sepharose CL-4B, nuevamente y Red-Sepharose a 510 nm, calculando las diferencias de absorción correspondientes a cada una de las longitudes de onda.

Estas diferencias de absorción se relacionaron con el

coeficiente de extinción de los colorantes y se obtuvo, de esta forma, el número de miligramos de colorantes unidos por gramo de resina. Los valores obtenidos fueron de 1.20 mg de Cibacron Blue F3GA por gramo de resina, en el caso de la Blue-Sepharose y 0.93 mg de Proción Red HE 3B por gramo, en el caso de la Red-Sepharose.

2.4.4. Interacción de las toxinas con colorantes triazínicos inmovilizados

2.4.4.1. Cromatografía de afinidad de α -sarcina en Blue-Sepharosa y en Red-Sepharosa en distintas condiciones

La interacción de la α -sarcina con colorantes triazínicos inmovilizados se estudió bajo distintas condiciones experimentales. Para ello, la resina Blue-Sepharose fue equilibrada en los siguientes tampones:

Condiciones experimentales A: La columna de Blue-Sepharose fue equilibrada en tampón 0.010 M Tris-HCl, 0.020 M NaCl pH 7.4, según describen Sperti y col (378).

Condiciones experimentales B: En estas condiciones, la resina fue equilibrada a valores de pH comprendidos entre 2 y 10, con incrementos de una unidad de pH en cada cromatografía. Para ello, se eligió en cada caso el tampón adecuado que permitiera obtener el valor de pH deseado y cuya fuerza iónica no excediese de 2.5 mS/cm. Los tampones, así como sus características, quedan recogidas en la tabla 2.7.

Condiciones experimentales C: En las condiciones experimentales C, se aumentó la concentración de tampón fosfato con respecto al tampón utilizado en B a pH 7; así, la resina se equilibró en tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.

En todos los casos se utilizaron columnas de 1.5 cm x 4.6 cm (8 ml) de Blue-Sepharose, equilibrada en el tampón correspondiente, en la que se cargaron 2 ml de una solución de α -sarcina a una concentración 3 mg/ml, disuelta en tampón de equilibrado. La columna fue eluida con un flujo de 25 ml/h con el mismo tampón, al que se añadió una concentración de 0.5 ó 1 M NaCl, recogiendo fracciones de 1 ml aproximadamente en las que se determinó la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro y la fuerza iónica.

Las fracciones eluidas de Blue-Sepharose, fueron analizadas en inmunodifusión radial contra un antisuero de conejo anti- α -sarcina.

La resina Red-Sepharose se montó en una columna de 1.5 cm x 5.0 cm (8.5 ml) equilibrada en tampón 0.005 M fosfato sódico, pH 7.0. En ella se cargó una muestra de α -sarcina a concentración de 2.5 mg/ml, eluyéndose con una concentración de 0.5 M NaCl en el tampón de equilibrado.

2.4.4.2. Cromatografía de afinidad en Affi-Gel Blue

La resina denominada Affi-Gel Blue, comercializada por BIO-RAD, es una resina formada por una matriz de agarosa a la que se le ha unido el colorante Cibacron Blue F3GA. Esta resina presenta una cantidad de colorante estimada en aproximadamente 1.9 mg de colorante por ml de gel según apuntan los fabricantes.

El tamaño de las partículas está comprendido entre menos 100 mesh y menos 200 mesh (entre 80 μ m y 150 μ m de diámetro), y ha sido utilizada por distintos investigadores en la purificación y fraccionamiento de soluciones de proteínas tales como quinasas, deshidrogenasas y otras enzimas dependientes de nucleótidos (433,434). También ha sido utilizada para la eliminación de la fracción de albúmina como paso previo a la purificación de anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico (435).

En todos los casos se tomaron muestras de 1 ml, con una concentración de 0.5 mg/ml, de las siguientes proteínas: cadena A de la ricina, briodina, gelonina, PAP-I, α -sarcina y mitogillina, cuyas características mas destacadas han sido resumidas en la tabla 2.1. Las muestras fueron cargadas en columnas de 1.0 cm x 2.5 cm (2 ml) de Affi-Gel Blue, equilibradas en tampón 0.1 M fosfato sódico, pH 7.4, que se eluyeron con un flujo de 30 ml/h. La proteína retenida por la matriz fue eluida con 0.5 M NaCl, añadido al tampón de equilibrado.

Sobre el total de proteína recuperada, se calculó el porcentaje correspondiente a las fracciones unida y no unida a la columna. Las fracciones fueron probadas en inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos y sobre las líneas celulares MCF-7 y MeWo.

2.4.5. Unión de la α -sarcina a una matriz de Sepharose CL-4B activada con bromuro de cianógeno (BrCN)

El procedimiento de unión de la α -sarcina a la matriz de Sepharose CL-4B se realizó según el procedimiento descrito por la casa comercial que distribuye el producto (436) y que brevemente es el siguiente: la Sepharose CL-4B activada con BrCN (Farmacia Fine Chemicals) fue hidratada en agua destilada, tras lo cual se lavó con una solución de 0.001 M HCl, sobre un filtro de vidrio Buchner conectado a una bomba de vacío, con el fin de eliminar el exceso de agua. El coeficiente de hidratación de la Sepharose CL-4B-BrCN es de 3.5 ml/gramo de resina seca.

Una vez lavada, la resina se resuspendió en tampón 0.1 M ácido carbónico/bicarbonato sódico, pH 8.3, 0.5 M NaCl al que se añadió α -sarcina a una concentración de 10 mg/ml. La mezcla se mantuvo con agitación durante 2 horas, a 40°C. Al cabo de este tiempo, el tampón se eliminó por filtración a vacío, y se determinó la cantidad de proteína ligada a la resina por diferencia de densidad óptica a 280 nm antes y después de la unión de la proteína a la resina.

Para bloquear los grupos amino de la Sheparose CL-4B activados que hubieran quedado libres tras la unión de la α -sarcina, la resina se incubó con una solución 1 M de etanola-

mina pH 8 y se mantuvo con agitación constante durante 1 hora. Finalizado el proceso, la resina se lavó tres veces con tampón 0.1 M ácido acético acetato sódico (AcH/AcNa), pH 4.0, 4.0 M NaCl y dos veces con tampón 0.1 M Tris-ácido bórico pH 8.2, 1 M NaCl, para eliminar las moléculas de proteína que no se han unido covalentemente a la matriz y para asegurar que todos los grupos libres capaces de reaccionar con otras proteínas han sido bloqueados.

La resina sintetizada, α -sarcina-Sepharosa CL-4B, se conservó en el tampón del último lavado, equilibrándose en tampón PBS cuando fue utilizada para la purificación de la IgG anti- α -sarcina (ver apartado 2.5.2.2.).

2.5. Técnicas inmunoquímicas

2.5.1. Preparación de antisueros policlonales y monoclonales

2.5.1.1. Obtención de un antisuero policlonal de conejo contra mitogilina

Para la obtención de un antisuero contra la mitogilina, los animales se inocularon en dos ocasiones. En la primera inoculación se inyectaron 800 μ g de mitogilina, disueltos en PBS y emulsionados con adyuvante completo de Freund H37 Ra (Difco, Michigan, USA), en proporción 1:2 v/v. La emulsión se produjo por tratamiento ultrasónico y se inyectó por vía intramuscular en las patas traseras del conejo.

Veinte días después de la primera inoculación, y tras comprobar por inmunodifusión radial (ver apartado 2.5.4.1.) la presencia de respuesta inmune en el conejo contra la proteína, se reinoculó al animal con 100 μ g de la misma muestra de antígeno disuelto en 4 ml de PBS que se inyectaron subcutáneamente en el lomo, repartidos en distintas localizaciones.

A los treinta días tras la reinoculación, se procedió a sangrar al animal de una vena de la oreja. Cuando se produjo la retracción de coágulo, se separó el suero que fue centrifugado a 1000 g durante 15 minutos, a 4°C, comprobándose la respuesta contra el antígeno nuevamente por inmunodifusión radial.

Cuando se detectó una actividad suficiente, el conejo se exsangüinó por sección de una de las venas yugulares. El suero obtenido se mantuvo congelado a -20°C.

2.5.1.2. Obtención de un antisuero policlonal de conejo contra la α -sarcina

En este caso, los conejos fueron inoculados en tres ocasiones. En la primera inoculación se inyectó 1 mg de α -sarcina en las condiciones descritas para la primera inyección de mitogilina, emulsionada por sonicación con adyuvante completo de Freund, en relación 1:3 v/v.

A los veinte días después de la primera inoculación, se

reinoculó al animal con 600 µg de α-sarcina disuelta en 2 ml de PBS y emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Difco), en relación 1:3 v/v. La emulsión se produjo por sonicación y se inyectó igualmente por vía intramuscular en las patas traseras.

Al cabo de dos meses, se realizó una tercera inoculación de antígeno. En este caso, se inyectaron 5 dosis crecientes entre 20 y 100 µg disuelta en PBS y con dos días de diferencia entre cada dosis. La inyección se realizó subcutáneamente en el lomo en distintas localizaciones.

A los veinte días tras la reinmunización, se procedió al sangrado periódico del animal de una vena de la oreja y a la obtención de suero específico contra la α-sarcina.

2.5.1.3. Obtención de un antisuero policlonal de conejo contra la ricina

El antisuero policlonal contra la ricina fue obtenido en un conejo New Zeland, de aproximadamente 3,5 Kg de peso. Como inmunógeno se utilizó una muestra de ricina, purificada por filtración en Sephadex G 100, que fue reducida con 2-β-mercaptoetanol (Merck) a una concentración final de 40 µM. Tras la reducción, la proteína se trató con glutaraldehído (Merck), a una concentración final del 0.5% v/v.

En una primera inoculación, se inyectaron 0.5 ml de la solución descrita, que contenían 0.047 mg de ricina total. La muestra fue emulsionada con adyuvante completo de Freund (Difco), en relación 1:3 v/v, por sonicación. La inyección se realizó en las patas traseras del animal.

Veinte días después de la primera inyección, se realizó una segunda inoculación con igual cantidad de ricina, emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Difco) e inoculada por vía subcutánea en distintos puntos del lomo del animal.

Transcurrido un mes después de la segunda inoculación, el animal fue sangrado periódicamente y el antisuero obtenido fue mantenido a -20°C.

2.5.1.4. Obtención del líquido ascítico de la cavidad intraperitoneal de ratones nu/nu Balb/c

La técnica más utilizada para la obtención de AcMos a partir de células de hibridomas, ha sido el cultivo de dichas células en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa nu/nu Balb/c (437). Estos ratones presentan un defecto hereditario, controlado por un gen recesivo que impide un desarrollo normal del timo, el cual permanece en estado rudimentario (437); este hecho ocasiona en los animales una respuesta inmune deprimida, que se manifiesta, entre otros síntomas, en una disminución drástica en los niveles de IgG, lo cual facilita la purificación de los AcMos acumulados en el líquido ascítico y derivados del crecimiento del linfoma (438).

Los ratones de la cepa nu/nu Balb/c fueron inoculados

intraperitonealmente con 0.5 ml de pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano) (Sigma) 15 días antes de la inyección de 1.500.000 células del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal. El pristano es un aceite mineral que induce la formación de ascitis (438).

Desde un principio, los ratones se mantuvieron en el animalario del *Istituto Nazionale dei Tumori*, en condiciones estériles y, tras la inyección de las células de hibridoma, se controlaron diariamente hasta que el crecimiento de las células inoculadas en la cavidad peritoneal del animal se hizo evidente por abultamiento del abdomen.

Según ha sido descrito en la literatura, así como ha sido observado en los experimentos incluidos en esta tesis, el tiempo que los ratones tardan en desarrollar el fluido ascítico es muy variable, ya que va desde los 5 a los 11 días (438), momento en el cual se observa el mayor abultamiento del abdomen. Puede estimarse en 8 días el período medio para el desarrollo de mismo.

La presencia de líquido ascítico pudo ser detectada por palpación del abdomen del animal, ya que en algunos casos, el crecimiento de las células del hibridomas produjo muy poco líquido o dió origen a tumores sólidos no productores de ascitis.

Para proceder a la extracción, el ratón se anestesió con eter etílico y se colocó en posición de cubito o boca arriba. Con unas tijeras estériles de punta curva, se efectuó una incisión longitudinal en la piel del abdomen, suficiente para que pudiera introducirse la punta de una pipeta pasteur esteril a través del peritoneo. De esta forma, el líquido ascítico se extrajo por aspiración.

El líquido ascítico fue centrifugado a 1.500 g, durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga de mesa Vismara (Vismara Associate s.r.l., Milán, Italia), con el fin de separar las células del hibridoma. A partir del sobrenadante obtenido en esta centrifugación, se procedió a la purificación del anticuerpo monoclonal según se describe en el apartado 2.5.2.3.

2.5.2. Purificación de inmunoglobulinas

2.5.2.1. Purificación de IgG total a partir de suero de conejo

La purificación de la IgG total presente en los sueros de los conejos inmunizados, se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en una columna de proteína A de *Staphylococcus aureus*, ligada a una matriz de Sepharosa y denominada proteína A-Sepharosa (Farmacia, Upssala, Suecia). El procedimiento cromatográfico utilizado fue similar al descrito por Vidal (421,439).

La proteína A-Sepharosa fue hidratada en tampón 0.025 M fosfato sódico, pH 7.4, 0.15 M cloruro sódico en presencia de azida sódica 0.1% v/v, abreviado como PBSaz, y se montó en una columna de dimensiones 2.0 cm x 2.5 cm (8 ml).

tampón	pH	conductividad (mS/cm)
Condiciones experimentales A:		
Tris HCl 10 mM NaCl 20 mM	7.4	2.68
Condiciones experimentales B:		
ácido cítrico/ citrato sódico 50 mM	2	1.75
ácido cítrico/ citrato sódico 50 mM	3	1.75
ácido cítrico/ citrato sódico 25 mM	4	1.93
ácido acético/ acetato sódico 25 mM	5	1.61
ácido acético/ acetato sódico 25 mM	6	2.09
fosfato sódico 25 mM	7	2.20
fosfato sódico 10 mM	8	1.85
Tris HCl 20 mM	9	0.24
Tris HCl 200 mM	10	0.37
Condiciones experimentales C:		
fosfato sódico 100 mM	7.4	10.30

Tabla 2.7. Tampones utilizados

En la tabla se recogen las características de los distintos tampones utilizados en el estudio de la interacción de la α -sarcina con colorantes triazínicos inmovilizados y en los que las resinas fueron equilibradas. En cada caso se indica el tipo de tampón, el valor de pH y la fuerza iónica de cada uno de ellos, según cada una de las condiciones experimentales utilizados. El procedimiento cromatográfico se describe en el apartado 2.4.4.1.

Una vez equilibrada, se cargó una alícuota de 10 ml de suero de conejo específico y se lavó con PBSaz hasta que el eluido presentaba una absorción a 280 nm menor de 0.05.

El material retenido en la columna fue eluido con tampón 0.2 M glicocola-HCl, pH 2.6. Se recogieron fracciones de 5 ml, sobre 0.2 ml de tampón 2.5 M Tris-HCl, pH 8.5, en las que se determinó la absorción a 280 nm. Aquellas fracciones cuya absorción era mayor de 0.1 se recogieron y dializaron contra PBS, tras lo cual fueron conservándose a -20°C. El perfil cromatográfico y el análisis en PAGE-SDS del material obtenido queda recogido en la figura 2.7.

Una vez finalizado la cromatografía, la proteína A-sepharose se equilibró en tampón PBS con azida sódica a una concentración final del 0.2% y se conservó a 4°C en la misma columna de vidrio.

2.5.2.2. Purificación de IgG específica contra α -sarcina a partir de suero de conejo

Para la purificación de la IgG específica contra α -sarcina, a partir del suero de conejo, se utilizó una columna de afinidad de α -sarcina-Sepharose CL-4B, sintetizada a partir de α -sarcina y una matriz de Sepharose CL-4B, activada con bromuro de cianógeno (BrCN)(Pharmacia), según se describe en el apartado 2.4.5.

La cromatografía se realizó según ha sido descrito para la obtención de IgG total, en el apartado anterior. Para ello, se cargaron 10 ml del antisuero de conejo en una columna de 2.0 cm x 3.0 cm (9.5 ml), equilibrada en tampón PBS, (0.025 M fosfato sódico, pH 7.4, 0.15 M NaCl). Cuando la columna estuvo lavada, la IgG se eluyó con tampón 0.2 M glicocola-HCl, pH 2.6 y se recogieron fracciones de 5 ml, sobre 0.2 ml de tampón 2.5 M Tris-HCl en las que se determinó la absorción a 280nm. Aquellas fracciones que contenían la IgG purificada, fueron conservadas a -20°C.

2.5.2.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales a partir del líquido ascítico

El líquido ascítico libre de células y centrifugado obtenidos según ha sido descrito en el apartado 2.5.1.4., se filtró a través de un filtro Millex de 0.22 μ m (Millipore) y el material filtrado fue diluido en una proporción 1:20 con tampón 0.010 M acetato sódico pH 4.9 y centrifugado a 12.000 g durante 30 minutos.

El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se precipitó con sulfato amónico, llevado hasta una concentración del 45% (Carlo Erba) que se mantuvo en agitación durante 1 hora, a temperatura ambiente. Tras la agitación, la solución se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 25°C. El precipitado obtenido se disolvió en tampón 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3 y se dializó contra el mismo tampón, al que había sido añadido 0.5 M NaCl.

En el caso en que el anticuerpo monoclonal fuera una IgM, el

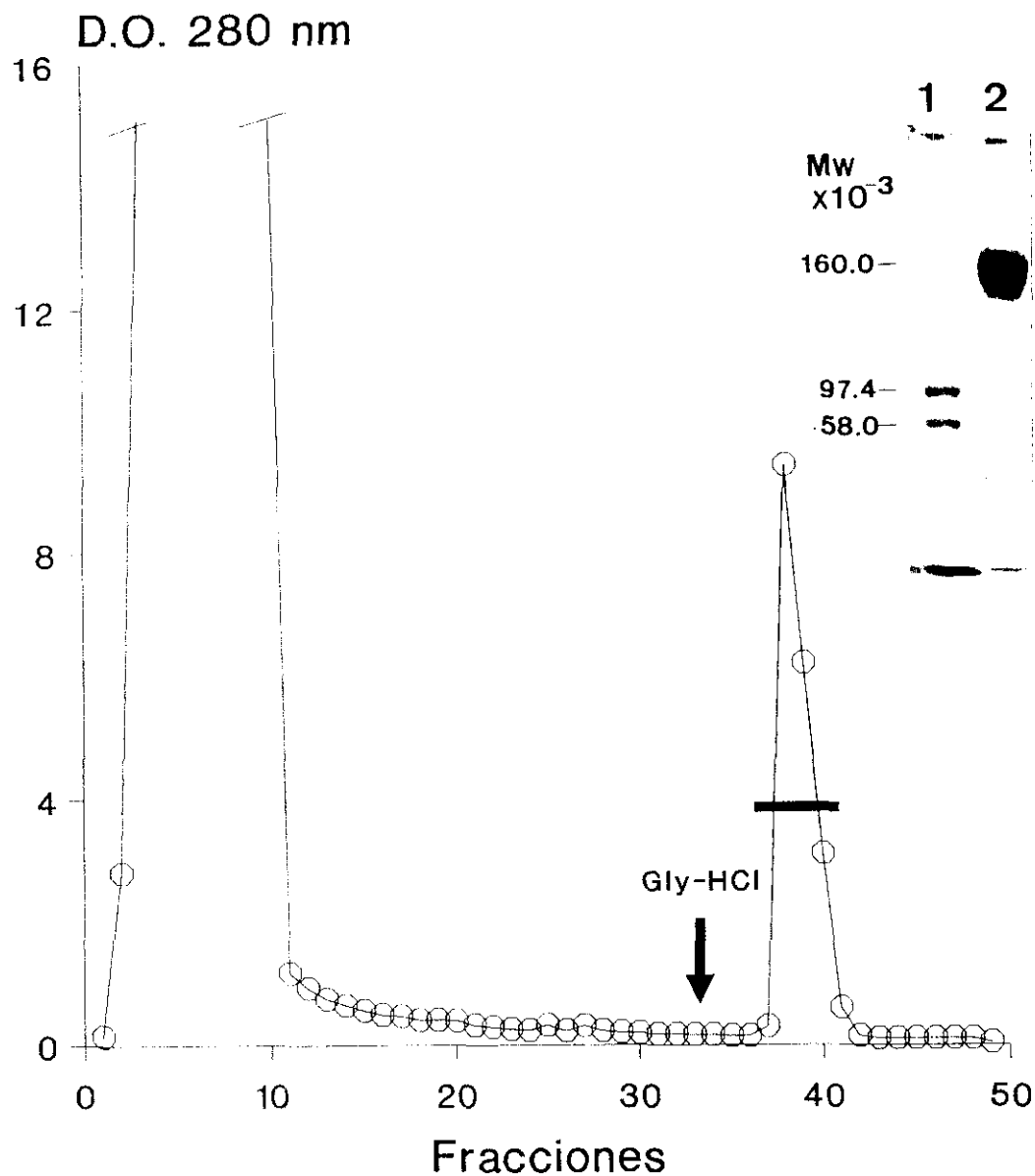


Figura 2.7. Cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharose

En la figura se recoge en perfil cromatográfico de la purificación de la IgG total a partir de un suero de conejo en una columna de proteína A-Sepharose (2.0 cm x 2.5 cm), equilibrada en PBS-az y eluida con tampón 0.2 M glicocola-HCl, pH 2.6 según se describe en el apartado 2.5.2.1. La flecha indica la fracción a partir de la cual se aplicó a la columna el tampón de elución. Las fracciones que presentan densidad óptica a 280 nm, fueron analizadas en PAGE-SDS, cuyo resultado se recoge así mismo en la figura. En el pocillo 1 se aplicaron los marcadores de peso molecular y en el pocillo 2, 25 μ g del material eluido en el pico de proteína A-Sepharosa.

material dializado fue sometido a cromatografía en una columna de Sepharosa 6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia), de dimensiones 1.5 cm x 90 cm (159 ml) equilibrada en tampón 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.5 M NaCl, de la que la inmunoglobulina eluye en volumen excluido.

Cuando se trataba de anticuerpos monoclonales de clase IgG, el material dializado fue aplicado en una columna de afinidad proteína A-Affi Gel (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), de dimensiones 1.5 cm x 9.0 cm (16 ml), equilibrada en tampón 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.5 M NaCl, que se eluyó con tampón glicocola-HCl, pH 2.8.

2.5.3. Estudios de la inmunogenicidad de las toxinas en ratones Balb/c

2.5.3.1. Determinación de la inmunogenicidad de las toxinas en ratones Balb/c

Los estudios de inmunogenicidad de las toxinas en ratones se realizaron siguiendo dos protocolos de inmunización diferentes, denominados método 1 y método 2.

Método 1. En este método, se inocularon por vía intraperitoneal grupos de 3 a 5 ratones Balb/c, de aproximadamente 20 gramos de peso, con dosis semanales de 100 µg de restrictocina y de la cadena A de la ricina en solución salina, durante 4 semanas. Una semana después de la última inoculación, los ratones fueron sangrados con el fin de comprobar el desarrollo de la respuesta inmune en los animales.

Método 2. En este segundo caso, se valoró nuevamente la inmunogenicidad de la cadena A de la ricina, de la gelonina y de la PAP en comparación con la α -sarcina. Para ello, se inocularon distintos grupos de ratones, durante 8 semanas consecutivas, con dosis semanales de 40 µg de RCA, gelonina y PAP-I, divididas en 20 µg inoculados por vía subcutánea y 20 µg por vía intraperitoneal y con 80 µg de α -sarcina, 40 µg inoculados por vía subcutánea y 40 µg por vía intraperitoneal.

En ambos métodos, la valoración de la presencia en el suero de los animales de anticuerpos contra las toxinas, se llevó a cabo mediante un radioinmunesayo en fase sólida, según se describe en el apartado 2.8.2.2.2.. En esta valoración, se añadieron diluciones sucesivas en tampón fosfato salino del suero de ratón, a los pocillos de placas de 96, incubadas previamente con 1 µg de antígeno.

Tras la incubación se añadió en todos los pocillos una muestra de IgG de cabra contra el fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG de ratón (α -7S), marcado con ^{125}I (ver apartado 2.8.1.).

Los resultados obtenidos se expresaron como Índice de Unión de los sueros a los pocillo, tomando como referencia el número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos cuando estos se incubaron con una dilución similar de suero de ratones no

inoculados con ningún antígeno.

2.5.3.2. Protocolos de inmunización de ratones Balb/c con α -sarcina

Grupos de 3-5 ratones Balb/c fueron inoculados semanalmente con dosis de 100 μ g de α -sarcina durante 2 meses y hasta un total de 8 inyecciones, según los siguientes protocolos de inmunización:

Primer grupo: Los ratones fueron inoculados en todos los casos, con la muestra de α -sarcina en solución salina por vía intraperitoneal y por vía subcutánea

Segundo grupo: La solución de α -sarcina (0.1 mg/ml) se emulsionó con adyuvante completo Freund, en proporción 1:2 v/v en la primera inmunización y con adyuvante incompleto de Freund también en proporción 1:2 v/v en las siguientes inoculaciones.

Tercer grupo: En este caso los animales fueron inoculados con una muestra de toxina tratada con una solución de 25% v/v de glutaraldehído, en presencia de adyuvante completo Freund en proporción 1:2 v/v en la primera inoculación y adyuvante incompleto en las 7 restantes.

Cuarto grupo: inoculado con una muestra de proteína tratada con glutaraldehído 0.25% v/v y en presencia de hemocianina de molusco (Keyhole limpet haemocyanin, KLH), como transportador, según el protocolo descrito por Gullick y col (9). Así, se mezclaron 5 mg de antígeno con igual cantidad de KLH (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA), en 145 μ l de PBS y se añadieron 5 μ l de una solución al 25% v/v de glutaraldehído. La solución se mezcló durante 15 minutos y transcurrido dicho tiempo, se inoculó en el ratón la dosis correspondiente, conservando el resto de la mezcla a 4°C.

En todos los casos, a partir de la cuarta inmunización, los ratones fueron sangrados y se comprobó la actividad contra α -sarcina y contra KLH, en aquellos animales inoculados con el transportador según el procedimiento de radioinmunoensayo descrito en el apartado 2.8.2.2., valorándose el Índice de Unión de los sueros a pocillos incubados con los antígenos.

2.5.4. Técnicas de inmunoprecipitación en geles de agarosa

Las técnicas de inmunoprecipitación se llevaron a cabo en geles de agarosa. Estas técnicas permitieron visualizar la unión entre un antígeno y su anticuerpo correspondiente ya que, tras la interacción, se forman agregados que precipitan en el gel cuando se alcanza el equilibrio de concentración entre ambas moléculas (440).

Los agregados resultan insolubles en tampones acuosos y se visualizan en el gel como una banda de color blanco traslúcido cuyas dimensiones están en relación compleja con la concentración

de los dos elementos que se mezclan (421).

Los geles de agarosa se prepararon a partir de una solución de agarosa Tipo V (Sigma) con un coeficiente de flujo electroendosmótico ($-m_r$) de 0.08, al 1% p/v en tampón 0.050 M Tris-HCl, pH 8.2, con azida sódica al 0.1% p/v. Esta suspensión de agarosa mantenida en agitación, se calentó en un matraz hasta que el tampón estuvo a punto de ebullición, momento en el que la agarosa se disuelve. A partir de aquí, la preparación de los geles presentó características particulares para cada técnica.

2.5.4.1. Inmunodifusión doble en dos dimensiones

Esta técnica se caracteriza en que los dos componentes de sistema antígeno-anticuerpo difunden, de manera que la precipitación se produce en aquellos puntos del gel de agarosa en los que las concentraciones de ambos alcanzan el equilibrio de precipitación (441).

Los geles de agarosa se prepararon en placas de vidrio de 5 cm x 7.5 cm colocadas en posición horizontal, en las que se vertieron 10 ml de la solución de agarosa 1% p/v en tampón 0.01 M Tris-HCl pH 7.8, 0.1% p/v de azida sódica, en caliente, dejándolo gelificar a temperatura ambiente, al menos durante 1 hora.

Cuando las inmunodifusiones se realizaron con muestras de ricina, a la solución de agarosa se añadió detergente Tritón X-100 a una concentración del 0.5% p/v.

Una vez que la agarosa hubo solidificado, se excavaron pocillos de diámetro entre 3 mm y 5 mm, donde se colocaron las soluciones de antígeno y de anticuerpo. Ambas soluciones se dejaron difundir durante 24 horas, en una atmósfera saturada de vapor de agua y con azida sódica.

Transcurrido dicho tiempo, los geles de agarosa se lavaron 3 veces consecutivas con tampón salino PBSaz al 0.1% p/v, durante 48 horas. Cuando estuvieron lavados, se secaron sobre la cara hidrofílica de una hoja de "Gel Bond Film" (Miles, España) entre papeles de filtro humedecidos con agua y con un peso aproximado de 1.5 kg, durante 2 horas; después se tiñeron con una solución de colorante Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma) al 0.5% p/v en metanol:ácido acético:agua (45:10:45) durante 2 minutos. El exceso de colorante se eliminó por lavado en el disolvente de la solución de coloreado.

2.5.4.2. Inmunodifusión radial simple

Esta técnica se denomina inmunodifusión radial simple o técnica de Mancini (422), ya que sólo uno de los componentes del sistema antígeno-anticuerpo es el que difunde, mientras que el otro se incluye en la agarosa. Cuando es el anticuerpo el que se incluye en el gel de agarosa, la técnica se denomina Mancini Directo (422). En este tipo de inmunodifusión, la presencia de precipitados antígeno-anticuerpo se visualiza en forma de halos alrededor de los pocillos.

La técnica se llevó a cabo en placas de plástico (Miles-Martin Laboratories, S.A.E., Madrid, España), sobre las que se vertieron 10 ml de una solución de agarosa al 1% p/v en tampón 0.05 M Tris-HCl pH 8.2 con 0.1% p/v de azida sódica, y con un 4 % v/v de suero anti- α -sarcina de conejo o un 10% v/v de suero anti-restrictocina. Los geles obtenidos presentaron un espesor homogéneo de 0.15 cm.

Una vez que la agarosa hubo gelificado, se tallaron pocillos de 3 mm de diámetro en los que se aplicaron las distintas soluciones de proteína. Como control interno de la inmunodifusión, se aplicó una muestra de antígeno de concentración conocida.

Las muestras se dejaron difundir durante 48 horas, a temperatura ambiente, en atmósfera saturada de vapor de agua y en presencia de azida sódica. Al cabo de las 48 horas, se consideró que el tamaño de los halos de precipitado antígeno-anticuerpo se había estabilizado.

Cuando la inmunodifusión se dio por finalizada, el gel se lavó, se prensó y tiñó como ha sido descrito en el apartado anterior. Se midió el tamaño de los halos y la concentración de proteína se calculó por interpolación en la recta patrón.

2.5.4.3. Obtención de una recta patrón por Mancini

Para la obtención de la recta patrón se prepararon placas de mancini según ha sido descrito en el apartado anterior, en las que se aplicó un antisuero de conejo contra la restrictocina a una concentración del 10 % v/v. Cuando las placas estuvieron listas, se aplicaron 10 μ l de muestras de α -sarcina, entre 800 y 134 μ g por pocillo y por duplicado.

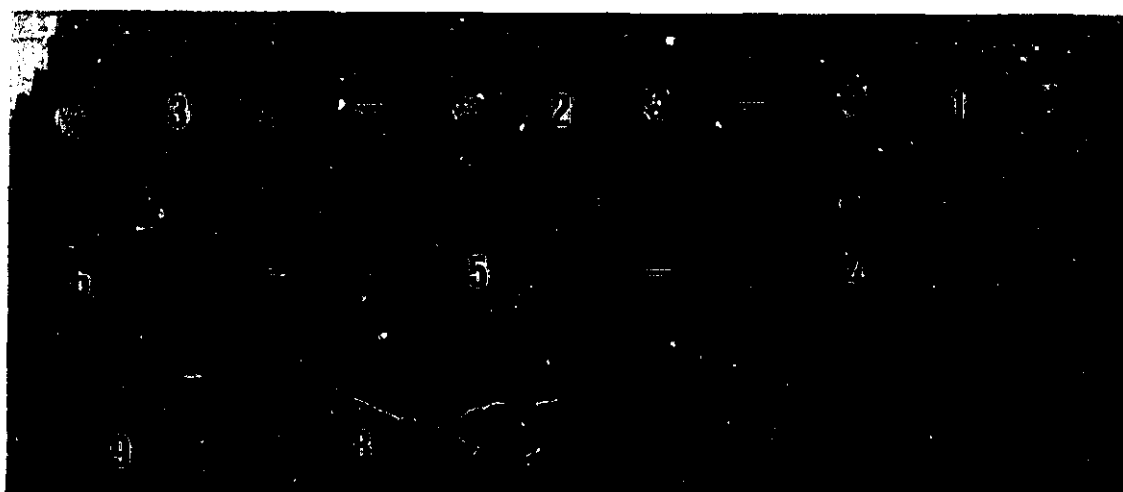
Las muestras se dejaron difundir durante 48 horas. Al cabo de este tiempo fueron lavadas, prensadas y coloreadas según ha sido descrito. Se determinó el diámetro de los halos y se obtuvo la recta correspondiente por regresión lineal. Los resultados se recogen en la figura 2.8.

2.5.5. Técnicas de inmunoelectroforesis

2.5.5.1. Inmunoelectroforesis en geles de agarosa

La técnica se realizó utilizando como soporte láminas de vidrio de 8 cm x 12 cm, colocadas en posición horizontal, sobre las que se vertieron 20 ml de una solución de agarosa tipo V de Sigma, al 1% p/v en tampón 0.19 M glicina, 0.025 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.1% p/v de azida sódica.

Cuando el gel hubo solidificado, se procedió a recortar en el mismo con un bisturí de cuchilla doble, tiras longitudinales de aproximadamente 0.2 cm de anchura y 10 cm de longitud, que permitieron delimitar los pocillos en donde, finalizada la electroforesis, se aplicó el antisuero. En el centro geométrico del gel de agarosa se tallaron pocillo de 3 mm de diámetro en los que se aplicaron entre 20 μ l y 50 μ l de las distintas soluciones



Recta patrón de Mancini:

$$y = 2.554404 * \ln X - 8.072979$$

$$r^2 = 0.984766 \text{ para } n = 9$$

$$x = \mu\text{g de proteína/pocillo}$$

$$y = \text{diámetro del halo en mm}$$

Figura 2.8. Recta patrón de α -sarcina en inmunodifusión radial o Mancini

En la figura aparece reproducida la placa de inmunodifusión radial obtenida cuando se aplicaron distintas alícuotas de una muestra de α -sarcina de concentraciones comprendidas entre 0.5 mg/ml y 0.001 mg/ml e indicadas como [1] a [9], sobre un gel de agarosa al 1% p/v, que contenía un 10% p/v de antisuero contra la restrictocina. La preparación de las placas de agarosa y el procedimiento de desarrollo del mancini, se recogen en el apartado 2.5.4. A partir de los diámetros de los halos de difusión, se obtuvo la recta de regresión lineal, cuya fórmula se especifica debajo de la figura y que permite determinar la concentración de α -sarcina en las distintas muestras ensayadas.

de antígeno.

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de desarrollo horizontal, utilizando como tampón de electroforesis 0.1 M glicina, 0.034 M Tris pH 8.6, a 120 V y 15 mA durante 2 horas. Como control de la misma se aplicaron, a la altura de las muestras, 10 µl de una mezcla de albúmina de suero bovino (BSA de Sigma) y azul de bromofenol (Merck) disueltos en agua destilada, de manera que la electroforesis se dio por finalizada cuando la mancha de albúmina coloreada con el azul de bromofenol, se hubo desplazado aproximadamente 2.5 cm.

Tras la electroforesis, y ya fuera de la cámara, se eliminaron los trozos de agarosa que previamente habían sido cortados, y en los pocillos se aplicaron entre 150 µl y 300 µl del antisuero de conejo la α -sarcina. Las placas se mantuvieron en una cámara húmeda con 0.01% p/v de azida sódica durante 48 horas, tras lo cual se lavaron, secaron y tinieron con Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma), tal y como ha sido descrito para las inmunodifusiones (apartado 2.5.3.1.).

2.5.5.2. Inmunoelectroforesis en geles de agarosa o "Rocket"

Esta técnica es una variación de la inmunoelectroforesis descrita anteriormente y también se realizó en láminas de vidrio de 8 cm x 12 cm en posición horizontal, sobre las que se vertieron 20 ml de la misma solución de agarosa al 1% p/v en tampón 0.19 M glicina, 0.025 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.1% p/v de azida sódica, a la que se añadió una concentración final del 4% v/v de suero anti- α -sarcina de conejo.

La solución se añadió sobre la placa de vidrio en la que previamente se había colocado un soporte que permite la formación de pocillos de 0.2 cm de ancho por 0.5 cm de largo. Cuando la agarosa hubo gelificado, se retiró el soporte y en los pocillos se aplicaron 50 µl de las muestras.

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de desarrollo horizontal, utilizando como tampón de electroforesis 0.1 M glicocola, 0.034 M Tris, pH 8.6, a 120 V y 15 mA durante 2 horas. Como control de desarrollo de la electroforesis, se aplicaron, a la misma altura de las muestras, 10 µl de una mezcla de albúmina de suero bovino y azul de bromofenol en agua destilada, de manera que la electroforesis se dio por finalizada cuando la mancha de albúmina se hubo desplazado aproximadamente 2.5 cm.

Tras la electroforesis, las placas se mantuvieron en una cámara húmeda con 0.01% p/v de azida sódica durante 48 horas, tras lo cual se lavaron, secaron y tiñieron con Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma).

2.5.5.3. Inmunoelectroforesis cruzada o "Crossed"

Esta técnica también se lleva a cabo sobre geles de agarosa y consta de dos pasos, llamados dimensiones, que se realizan sobre placas de vidrio de 8 cm x 12 cm.

Para la primera dimensión se prepararon geles con 20 ml de una solución de agarosa al 1% p/v en tampón 0.125 M Tris-glicocola pH 8.6, 1.4% p/v de acrilamida polimerizada, 0.1% p/v de azida sódica.

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de desarrollo horizontal, utilizando como tampón de electroforesis 0.1 M glicocola,, 0.034 M Tris, pH 8.6, a 120 V, 18 mA, durante 90 minutos. Las calles por las que habían corrido las muestras se recortaron y se dispusieron sobre los huecos excavados en los geles de la segunda dimensión.

Para la segunda dimensión se hicieron geles con 20 ml de una solución de agarosa 1% p/v en tampón 0.125 M Tris-glicina pH 8.3, 0.1 % azida sódica, con 4% v/v de suero anti- α -sarcina de conejo. Una vez dispuestas las tiras de agarosa-acrilamida de la primera dimensión, se llevó a cabo una segunda electroforesis, en el mismo tampón que la primera dimensión, y a 30 V, 3 mA, durante 16 horas.

Transcurrido dicho tiempo, los geles se mantuvieron en atmósfera saturada de agua durante 48 horas con azida sódica, se lavaron, se secaron y se tiñeron, según el procedimiento descrito anteriormente.

2.6. Purificación de las toxinas

2.6.1. Purificación de la α -sarcina

2.6.1.1. Procesamiento del medio de cultivo

La purificación de la α -sarcina se realizó a partir de cultivo de 4.5 litros de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, crecido durante 13 días en el medio de cultivo 4 (ver tabla 2.6) y según se describe en el apartado 2.2.6.

Cuando el cultivo se dió por finalizado, se añadió mertiolato al 0.01% p/v (Merck), para inactivar el micelio. Transcurridas dos horas el medio se filtró en un embudo Buchner conectado al vacío, a través de papel de filtro. Con esta filtración se eliminó la mayor parte del micelio del hongo.

El medio filtrado se centrifugó para eliminar, tanto los restos de micelio que permanecen en suspensión, como los componentes del medio de cultivo no solubilizados durante la preparación del mismo. Esta centrifugación se llevó a cabo en una centrifuga refrigerada Dupont Instruments-Sorvall modelo RC 5, en un rotor GSA y en recipientes con una capacidad aproximada de 400 ml, a una velocidad de 16.000 g durante 20 minutos, obteniéndose un sobrenadante transparente de color marrón a partir del cual se purificó la α -sarcina.

2.6.1.2. Cromatografía en DE 23 cellulose

Una vez centrifugado, el medio presentaba un pH de aproximadamente 7, que fue ajustado a pH 4.5 con la adición de ácido

acético glacial (Riser, Barcelona, España), controlando el descenso del pH con un pH metro (modelo PHM83 autocal, Radiometer, Copenhagen, Islandia). Posteriormente, el medio se filtró a través de columna de DE 23 celullose (Whatman) equilibrada en tampón 0.025 M ácido acético acetato sódico, pH 4.5 (AcH/AcNa).

Según ha sido comprobado en sucesivas purificaciones, para que la cromatografía sea efectiva, es necesario utilizar una relación de 1 mililitro de resina por cada 30 mililitros de medio de cultivo filtrado.

El material eluido de la columna se recogió directamente en un matraz de 5 litros y se comprobó el valor de pH y de fuerza iónica que presentaba.

Cuando se realizó el análisis del material fijado a DE 23 celullose, la columna fue eluida con una solución de ácido acético 1 M en agua destilada. El material eluido fue aplicado en inmunodifusión radial en dos dimensiones (ver apartado 2.5.3.1) y analizado en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (ver apartado 2.3.7.).

2.6.1.3. Cromatografía en CM 23 celullose

Tras la cromatografía en DE 23 celullose, el material eluido, fue cargado en una columna de CM 23 celullose (Whatman), equilibrada en tampón 0.025 M AcH/AcNa pH 4.5. En este caso, se consideró como adecuada para el desarrollo de la cromatografía, una relación de 1 ml de resina por cada 10 ml de medio de cultivo filtrado. Una vez que hubo pasado la muestra, la columna se lavó con aproximadamente tres volúmenes del tampón de equilibrio, hasta que el eluido presentó una absorción a 280 nm inferior a 0.05.

Cuando la columna estuvo lavada, se eluyó con un gradiente de fuerza iónica entre 0 y 0.6 M NaCl en el tampón de equilibrado, con un flujo de 40 ml/hora, recogiendo fracciones de 5 ml. La elución se siguió a través de la medida de densidad óptica a 280 nm y de fuerza iónica de las fracciones.

A partir del perfil cromatográfico, se recogieron grupos de fracciones o picos, en los que se determinó la presencia de α -sarcina y su concentración en las distintas fracciones.

2.6.1.4. Filtración en Sephadex G-10

Las fracciones que contenían la proteína, fueron concentradas bajo atmósfera de nitrógeno, a través de una membrana de ultrafiltración Diaflo YM2 (Amicon), en una célula de Amicon de 450 ml, hasta un volumen de aproximadamente 20 ml. Posteriormente, la muestra fue filtrada a través de una columna de 4 cm x 35 cm (440 ml) de Sephadex G-10 (Pharmacia), equilibrada en una solución de 0.005 M NaCl. El Sephadex G-10 es una resina de filtración que presenta un rango de filtración entre 10.000 y 2.000 de peso molecular y, en este caso, se utilizó para eliminar el exceso de sales con que la proteína eluye de CM 23 celullose.

Se recogieron fracciones de 5 ml en las que se determinó la densidad óptica y la fuerza iónica.

Tras la filtración, las fracciones que eluyeron de la columna en volumen excluido y que presentaban absorción a 280 nm fueron recogidas conjuntamente y liofilizadas, tras ajustar el pH de la solución a un valor de 6.

Las muestras de proteína liofilizada se conservaron a 4°C en recipientes de plástico cerrados y en presencia de sílica gel, que evita que los liofilizados se rehidraten.

2.6.2. Purificación de la ricina

2.6.2.1. Obtención del extracto libre de células de semillas de *Ricinus communis* L.

Para la purificación de la ricina, se partió de doscientos cincuenta gramos de semillas decorticadas de *R. communis* L., que fueron triturados en un molinillo de café, con una pequeña cantidad de tampón 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.04 M lactosa (Merck) y 0.01 % azida sódica p/v, hasta obtener una pasta oleosa. Dicha pasta fue transferida a un matraz en el que previamente se había añadido un litro del mismo tampón.

La suspensión se mantuvo durante toda la noche con agitación en un agitador magnético, y a la mañana siguiente, se centrifugó a 270 g, durante 20 minutos a 4°C en recipientes de polivinilcloruro de aproximadamente 400 ml de capacidad, en una centrífuga Dupont Instruments-Sorvall modelo RC5, con un rotor GSA.

El sobrenadante de esta primera centrifugación, fue centrifugado nuevamente a 25.500 g, durante 20 minutos a 4°C. Esta operación se repitió dos veces eliminando los sedimentos obtenidos en ambas centrifugaciones. De la última centrifugación, se obtuvo un sobrenadante transparente de color marrón verdoso, que fue considerado como el extracto de las semillas de *R. communis*. En esta ocasión se obtuvieron 700 ml de dicho material.

Posteriormente, el extracto se precipitó con sulfato amónico al 80%, para lo que fue necesario añadir 410 gramos de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (Carlo Erba). Tras la precipitación, el material resuspendido en agua fue dializado, en primer lugar contra 60 volúmenes de agua destilada y, después, contra 60 volúmenes de tampón 0.01 M Tris-HCl, pH 8.2, 0.15 M NaCl.

2.6.2.2. Cromatografía en Sepharose CL-4B activada con HCl

La Sepharose CL-4B activada con 0.2 M HCl, según se describe en el apartado 2.4.2., se montó en una columna de 10 cm x 5 cm (392 ml), se equilibró en tampón 0.01 M Tris-HCl pH 8.5 y en ella se cargaron 450 ml, con 15.120 unidades ópticas totales, del material dializado. Tras lavar la columna hasta que la densidad óptica a 280 nm presentó un valor inferior a 0.05, se eluyó con el mismo tampón de equilibrado más 0.02 M lactosa (Merck), recogiendo fracciones de 10 ml.

Las fracciones eluidas fueron leídas en un espectrofotómetro DU 6, de Beckman, a 280 nm de absorbancia, y aquellas que presentaban densidad óptica se recogieron y se precipitaron nuevamente con 80 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. En este caso, fueron necesarios 547 g de sulfato amónico, ya que el volumen total obtenido al mezclar las fracciones fue de 980 ml.

El precipitado de sulfato amónico fue resuspendido en tampón 0.01 M Tris-HCl pH 8.2, 0.02 M lactosa y dializado contra 120 volúmenes del mismo tampón para eliminar el exceso de sales.

2.6.2.3. Cromatografía en Sephadex G-100

El material obtenido tras la diálisis, se sometió a una cromatografía de filtración en una columna de 4 cm x 34 cm (427 ml) de Sephadex G-100 (Pharmacia), equilibrada en tampón 0.01 M Tris-HCl pH 8.2, 0.02 M lactosa, 0.01 % azida sódica p/v. La columna se eluyó a un flujo de 45 ml/h y se recogieron fracciones de 5 ml, en las que se determinó la densidad óptica a 280 nm.

Las fracciones eluidas de Sephadex G-100, fueron analizadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y en inmunodifusión, utilizando un antisuero de conejo específico contra la ricina purificada.

2.6.2.4. Reducción de la ricina total

La fracción de ricina eluida de Sephadex G-100, fue reducida por la adición de 2-β-mercaptoetanol, hasta una concentración final de 40 mM.

La reducción se inició bajo atmósfera de nitrógeno y se prolongó por espacio de 1 hora. Transcurrido dicho tiempo, la muestra se dializó contra tampón 0.010 mM Tris-HCl pH 6.58, 0.020 mM Lactosa, 0.002 M 2-β-mercaptoetanol.

2.6.3. Purificación de la briodina

2.6.3.1. Obtención del extracto de raíces de *Bryonia dioica* Jacq.

Para la obtención del extracto de las raíces de *Bryonia dioica* Jacq. se partió de 289 g de material, que se mojaron en 800 ml de tampón 0.005 M fosfato sódico, pH 7.4, 0.14 M NaCl, y fueron sometido a trituración y homogeneización, utilizando una batidora de cocina marca Osterizter.

El homogeneizado se mantuvo en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente, tras lo cual fue sometido a tres centrifugaciones sucesivas en centrifuga Sorvall modelo RC 5: a 2.000 g, durante 20 minutos a 4°C; a 25.500 g durante 30 minutos a 4°C y, por último, nuevamente a 25.500 g durante 60 minutos a igual temperatura. En los tres casos se eliminaron los sedimentos obtenidos, recogiendo los sobrenadantes.

El sobrenadante obtenido de la última centrifugación, fue considerado como el extracto de raíces y se utilizó para la purificación de la briodina. La concentración de proteína en el extracto fue determinada por Lowry (423) y el material obtenido fue analizado en PAGE-SDS, en presencia de urea 6M.

El sobrenadante de la tercera centrifugación, que representó un volumen de 710 ml. se sometió a precipitación con una concentración final del 80% de sulfato amónico (Carlo Erba), para lo que fueron añadidos 489 gramos.

El precipitado obtenido fue resuspendido en 65 ml de tampón fosfato sódico 0.005 M, pH 6.6, 0.14 M NaCl. La muestra se centrifugó a 25.000 g, durante 20 minutos a 25°C para eliminar los agregados, y el sobrenadante se procesó en las condiciones descritas a continuación.

2.6.3.2. Cromatografía en CM-Sepharose Fast Flow

Como siguiente paso de purificación, la muestra fue sometida a cromatografía de intercambio iónico en una columna de 4 cm x 27.5 cm (345 ml) de CM-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), equilibrada en tampón fosfato sódico 0.005 M pH 6.6.

El material retenido en la columna fue eluido con un gradiente de fuerza iónica entre 0 y 0.2 M NaCl, añadido al tampón de equilibrado. Se recogieron fracciones de 5 ml en las que se determinó la densidad óptica a 280 nm y la fuerza iónica. y el material de las distintas fracciones fue analizado en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y urea 6 M.

2.7. Preparación de las inmunotoxinas

2.7.1. Reacción de las aspergilinas con SPDP

Alicuotas de α -sarcina y de restrictocina, a una concentración aproximada de 2.5 mg/ml, en tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.4, 0.15 M NaCl, se hicieron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, con un exceso 3 veces molar de N-succinidimil 3-(2-piridil ditio) propionato, abreviado como SPDP (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) disuelto en etanol absoluto (Merck), según una modificación del método de Carlsson y col (326).

Transcurrido el tiempo de reacción, la muestra fue filtrada a través de una columna de Bio-Gel P-60G (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) de 1.5 cm x 30 cm (53 ml). equilibrada en tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.4, 0.15 M NaCl, para eliminar el exceso de SPDP que no ha reaccionado con la proteína.

Estas especies moleculares fueron denominadas como aspergilina-PDP: α -sarcina-PDP y restrictocina-PDP, respectivamente.

2.7.2. Reducción de los grupos PDP incorporados a las aspergilinas

Las fracciones eluidas de Bio-Gel P-6DG que contenían la proteína, se llevaron a pH 5.5 con la adición de tampón 1 M ácido cítrico/citrato sódico, pH 4.5. Tras ajustar el pH, los grupos 2-piridil ditio propionato (PDP) incorporados a la molécula de aspergilina, fueron reducidos con la adición de ditioneitol (DTT) (Bio-Rad) a una concentración final de 0.050 M, durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se separaron por filtración en la misma columna de Bio-Gel P-6DG, según ha sido descrito anteriormente.

Las fracciones que eluyeron en volumen excluido contenían las moléculas de α -sarcina-PDP y restrictocina-PDP, con los grupos PDP reducidos. Estas especies moleculares fueron denominadas genéricamente como aspergilina-SH o activada y, en particular, α -sarcina-SH o activada y restrictocina-SH o activada.

Esta última reacción de reducción de los grupos PDP incorporados a la molécula de proteína, no se llevó a cabo en el experimento de conjugación de la α -sarcina con el anticuerpo monoclonal MINT-5, en el que fueron los grupos MPT unidos al AcMo los que se sometieron a reducción.

2.7.3. Reacción de los anticuerpos monoclonales con agentes bifuncionales

2.7.3.1. Reacción de los anticuerpos monoclonales con SPDP

Alícuotas de los anticuerpos monoclonales purificados, a una concentración aproximada de 6 mg/ml, fueron dializadas contra tampón 0.05 M ácido bórico/borato sódico pH 8, 0.15 M NaCl.

Tras la diálisis, el anticuerpo se hizo reaccionar durante 1 hora con un exceso 30 veces molar de SPDP, cuando se trataba de una inmunoglobulina de clase IgM, o con un exceso entre 30 y 10 veces molar de SPDP, en el caso de los anticuerpos IgG, disueltos, en ambos casos, en etanol absoluto. Transcurrido este tiempo, los productos de reacción se separaron en una columna de Bio-Gel P-6DG, de dimensiones 1.5 cm x 30 cm (53 ml), equilibrada en tampón 0.05 M ácido bórico/borato sódico pH 8, 0.15 M NaCl.

Las fracciones que contenían el AcMo se recogieron a parte, y en ellas se determinó la cantidad de grupos 2-piridil ditio propionato (PDP) incorporados. A esta especie molecular se le denominó AcMo-PDP.

2.7.3.2. Reacción del anticuerpo monoclonal MINT-5 con SMPT

Al igual que ha sido descrito para la reacción de los demás anticuerpos monoclonales con SPDP, se partió de una alícuota de MINT-5 purificado, a una concentración de 6 mg/ml que fue dializada contra tampón 0.05 M ácido bórico/borato sódico pH 8, 0.15 M NaCl. Tras la diálisis, el AcMo se hizo reaccionar con un exceso 3 veces molar de 4-succinimidil oxycarbonil- α -metil- α (2-piridil ditio) butirato, abreviado como SMPT (Pierce, Rockford,

IL, USA) en presencia de una concentración de 10% v/v de dimetilformamida (DMF) (Sigma), según describen Thorpe y col (336).

La solución se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y los productos de reacción se separaron por diálisis contra tampón 0.1 M fosfato sódico, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA. A la especie molecular resultante de la reacción se le denominó MINT-5-MPT.

2.7.3.3. Reducción de los grupos MPT incorporados a MINT-5

Tras ajustar el pH de la solución a un valor de 5.5, con la adición de tampón 1 M AcH/AcNa, pH 4.5, el anticuerpo monoclonal unido a los grupos metil- α -(2-piridilditio)-tolueno (MPT), fue tratado con 0.050 M Ditiotreitól (DTT), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y aplicado en una columna de Bio-Gel P-6DG, equilibrada en tampón 0.1 M fosfato sódico, pH 7.4, 0.15 M NaCl.

2.7.4. Evaluación del número de grupos PDP y MPT incorporados a los anticuerpos monoclonales

La evaluación aproximada del número de grupos PDP incorporados por molécula de toxina y de anticuerpo monoclonal, se realizó por análisis espectrofotométrico a 343 nm de los grupos piridina 2-tionato que se liberan tras la reducción de la molécula derivada con DTT, a una concentración final de 25 mM según describen Carlsson y col (442), considerando que los grupos piridina 2-tionato presentan un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El número de grupos α -metil- α -(2-piridilditio) toluil (MPT) activos introducidos en cada anticuerpo monoclonal se determinó de igual forma, por reducción de la muestra de MINT-5-MPT con 0.025 M DTT, que produce la liberación de grupos piridina-2-tionato al medio (336).

2.7.5. Reacciones de conjugación

2.7.5.1. Reacción de conjugación entre AcMo-PDP y aspergilina-SH. Purificación de las inmunotoxinas

El material resultante de la reacción del anticuerpo monoclonal con el agente de unión SPDP, AcMo-PDP, se mezcló con un exceso 5 veces molar de las fracciones de aspergilina-SH o activada.

La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual el material de reacción fue cargado en una columna de filtración de 1.5 cm x 100 cm (176 ml) de Ultragel AcA 44 (LKB, Produkter AB Bromma, Suecia) equilibrada en tampón 0.05 M ácido bórico/borato sódico, pH 8, 0.15 M NaCl. La reacción de conjugación, se esquematiza en la figura 2.9.

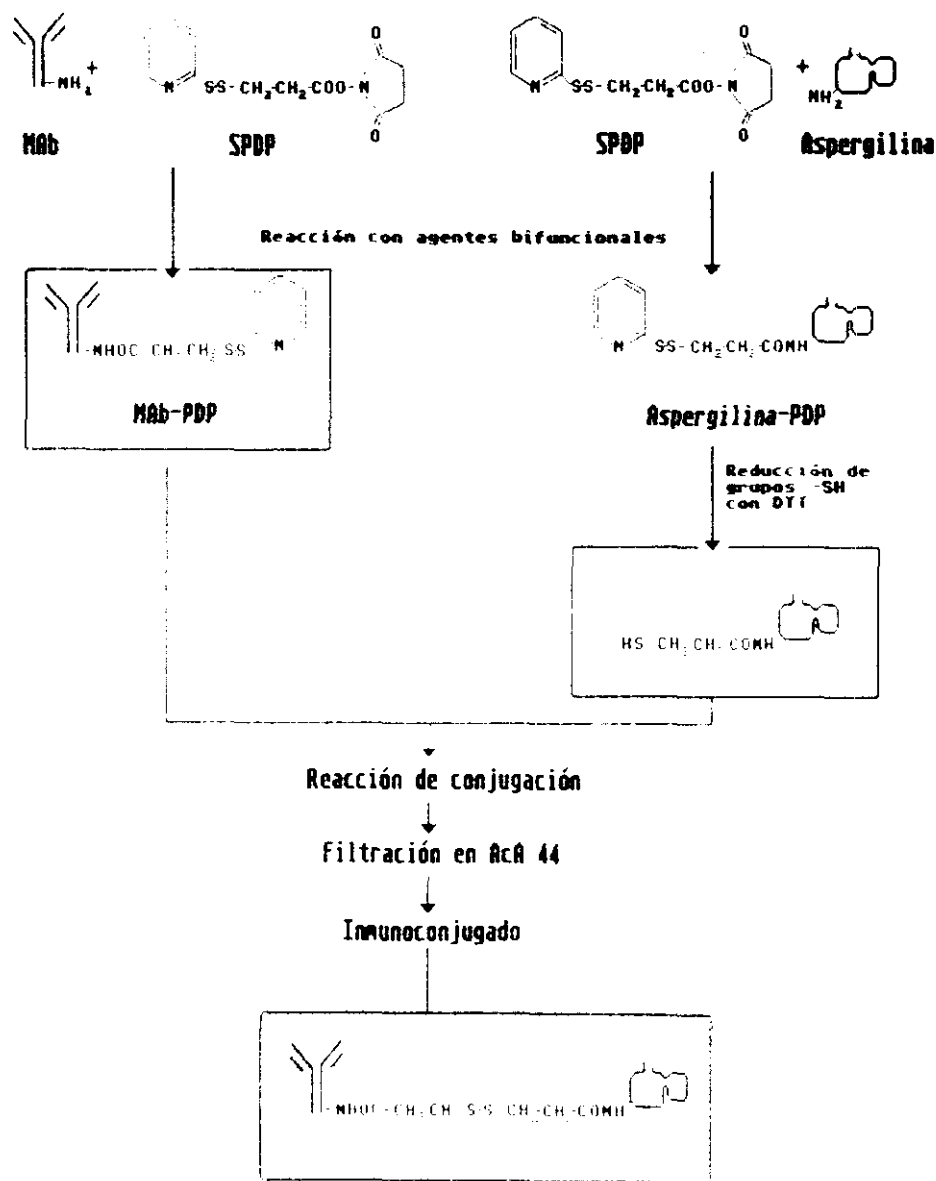


Fig. 2.9. Método de conjugación de las aspergilinas con anticuerpos monoclonales

En la figura se esquematiza el proceso de conjugación de las aspergilinas α -sarcina y restrictocina con los distintos anticuerpos monoclonales a través de SPDP. Como puede observarse, tanto los anticuerpos monoclonales (Mab) como las toxinas, se hacen reaccionar previamente con SPDP, según se describe en el apartado 2.7., posteriormente, la molécula de aspergilina-PDP, es reducida con ditiotretitol y conjugada con la fracción AcMo-PDP. Tras la reacción de conjugación, la inmunotoxina se purificó por filtración en ACA 44. (ver apartado 2.7.5.1.).

2.7.5.2. Reacción de conjugación entre MINT-5-MPT con α -sarcina-PDP. Purificación de las inmunotoxinas

El anticuerpo monoclonal MINT-5, unido a grupos MPT y reducido con DTI, se hizo reaccionar con un exceso 3 veces molar de α -sarcina-PDP, durante 80 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se añadió iodoacetamida en exceso para parar la reacción.

La mezcla de reacción fue sometida a filtración en una columna de Ultragel AcA 44 de dimensiones 1.5 cm x 47 cm (83 ml) equilibrada en tampón 0.010 M fosfato potásico, pH 6.8. Las fracciones eluidas de AcA 44 fueron analizadas en PAGE-SDS, según se describe en el apartado 2.3.7.

Las fracciones que contenían el material de peso molecular comprendido entre 150.000 y 340.000 fueron recogidas independientemente y aplicadas en una columna de hidroxilapatita Bio-Gel HPHT de 0.78 cm x 10 cm (4.8 ml) (Bio-Rad), equilibrada en tampón 0.01 M fosfato sódico, pH 6.8 en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) HRLC Systems, serie 500 de Bio-Rad Laboratories.

El material unido a la columna de hidroxilapatita, fue eluido con un gradiente de fuerza iónica entre 0.01 M y 0.35 M NaCl, en el tampón de equilibrado y se recogieron fracciones de 1 ml. La reacción de conjugación entre MINT-5 y α -sarcina, se esquematiza en la figura 2.10.

2.7.5.3. Reacción de conjugación de MBr 1 con la cadena A de la ricina. Purificación de las inmunotoxinas

La reacción de conjugación entre el anticuerpo MBr 1 y la cadena A de la ricina, se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Canevari y col (332). Para ello el MBr 1 unido a grupos PDP se mezcló con un exceso 5 veces molar de la cadena A de la ricina (Calbiochem), que previamente había sido sometida a reducción con una concentración final de 0.1 M de 2- β -mercaptoetanol y dializada exhaustivamente contra tampón 0.05 M ácido bórico/borato sódico, pH 8, 0.5 M NaCl.

La mezcla de reacción fue sometida a agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el producto de reacción se aplicó en una columna de filtración de Ultragel AcA 44 de dimensiones 1.5 cm x 100 cm (176 ml), equilibrada en tampón 0.05 M ácido bórico/borato sódico, pH 8, 0.5 M NaCl.

2.7.6. Determinación del número de moléculas de toxina incorporadas por molécula de anticuerpo monoclonal

En todos los casos, el número de moléculas de toxina incorporado por molécula de AcMo fue determinado por análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida en presencia de SDS y de 2- β -mercaptoetanol, en los que se habían aplicado las muestras de las inmunotoxinas. Para ello se utilizó un densitómetro de E.C. Apparatus Corporation (St. Petesburgo, Florida U.S.A.) distribuido por JDI (Madrid, España).

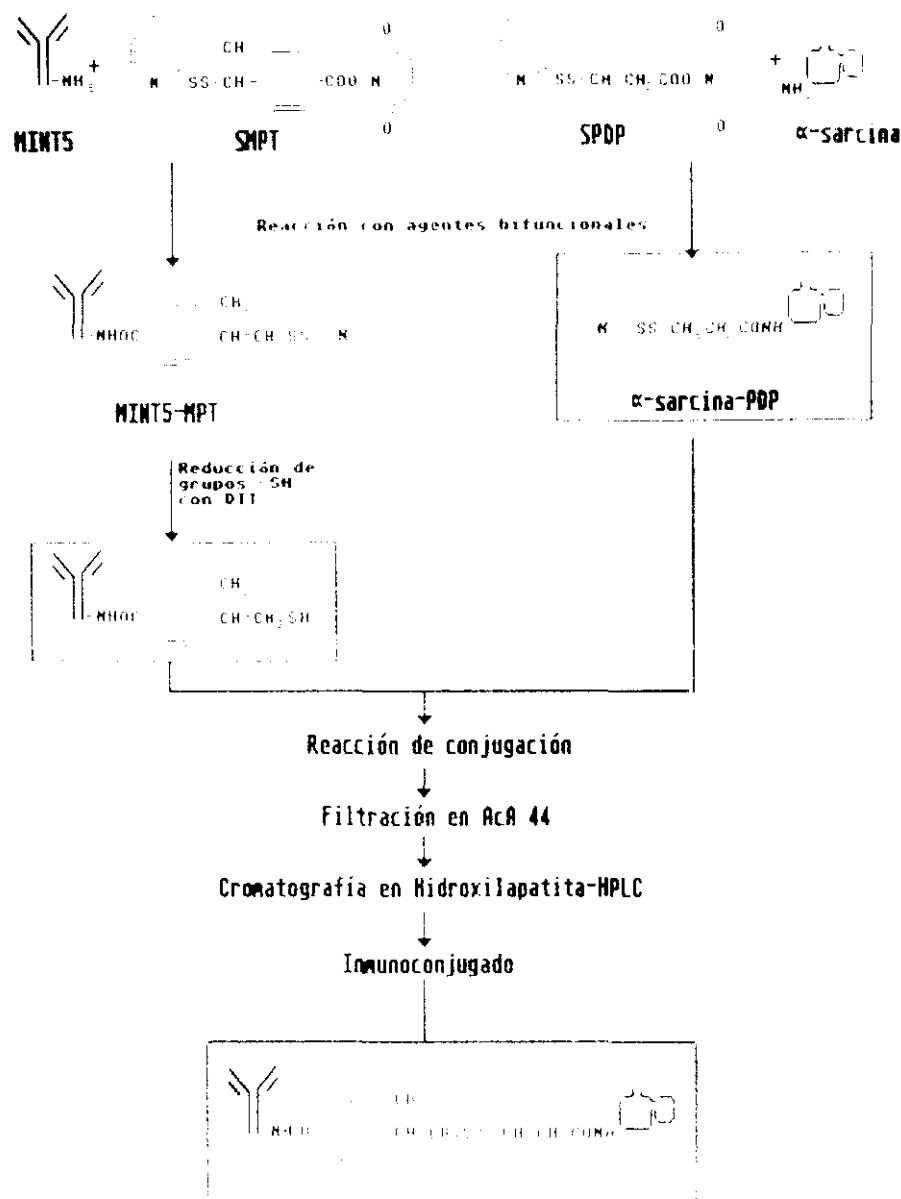


Fig.2.10. Método de conjugación de la α -sarcosina con MINT-5

En la figura se esquematiza el proceso de conjugación de la α -sarcosina con el anticuerpo monoclonal MINT-5. En este caso, el AcMo, se hizo reaccionar previamente con SMPT según se describe en el apartado 2.7.3.2., y fue reducido con ditiotretol, tras lo cual se conjugó con la fracción α -sarcosina-PDP. Tras la reacción de conjugación, se procedió a la purificación de las inmunotoxinas (ver apartado 2.7.5.2).

Este cálculo se realiza en función de los porcentajes de densidad que representa cada una de las bandas que aparecen en el gel, para ello fueron considerados los pesos moleculares de cada componente (aproximadamente 150.000 para la IgG y aproximadamente 17.000 para las aspergillinas), según la fórmula siguiente

$$\frac{\% \text{ de densidad de la banda de aspergilina} \times 150.000}{\% \text{ de densidad de la IgG} \times 17.000}$$

2.8. Técnicas de radiactividad

2.8.1. Marcaje radiactivo de proteínas

2.8.1.1. Marcaje de las toxinas con ^{125}I por el método del Iodogen

El marcaje de las aspergillinas y de la ricina con ^{125}I se realizó con yodo molecular generado por 1,3,4,6-tetracloruro-3a,6a difenilglicoluril (Iodogen) (443).

Antes de proceder al marcaje de las proteínas, 25 μl de una solución de Iodogen (Pierce, Rockford, USA) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en cloroformo (Merck), se secaron con nitrógeno en tubos de vidrio de 3 ml. Por tanto, cada tubo contenía 250 μg de Iodogen.

En el mismo tubo se añadieron 16 μl de una solución de 0.6 mg/ml de toxina y 50 μl de tampón 0.4 M fosfato sódico, pH 7.7. A esta solución se le añadieron 13 μl de una solución de 0.077 mg/ml de yoduro potásico (Sigma) en el mismo tampón y 0.8 μl de $^{125}\text{I}\text{Na}$ 0.36 mCi/ μl , (Amersham International plc., Buckinghamshire, Inglaterra) incubándose la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y con agitación ocasional.

Transcurrido dicho tiempo, la reacción se detuvo transfiriendo la muestra desde el tubo de reacción a un tubo que contenía 50 μl de una solución de 1 mg/ml de L-tirosina (Merck) y 50 μl de yoduro potásico (Merck) 10 mg/ml en tampón PBS-az, pH 7.4. De esta forma, la tirosina consumió el yodo residual que no se ha fijado a la proteína.

La purificación de la proteína marcada se llevó a cabo por filtración en una columna de Bio-Gel P-6DG (Bio-Rad) de 0.6 cm x 22 cm (6 ml), equilibrada en tampón PBS con BSA al 0.1% p/v. Se recogieron fracciones de 1 ml, de las que se tomaron alícuotas de 5 μl que fueron contadas en un contador de centelleo sólido (Packard modelo 5440, Illinois, USA).

El perfil de elución de Bio-Gel P-6DG, se recoge en la figura 2.11. Las fracciones que eluyeron en volumen excluido y presentaron radiactividad (de 3 a 6 ml del volumen de elución) contenían la proteína marcada, por lo que fueron recogidas

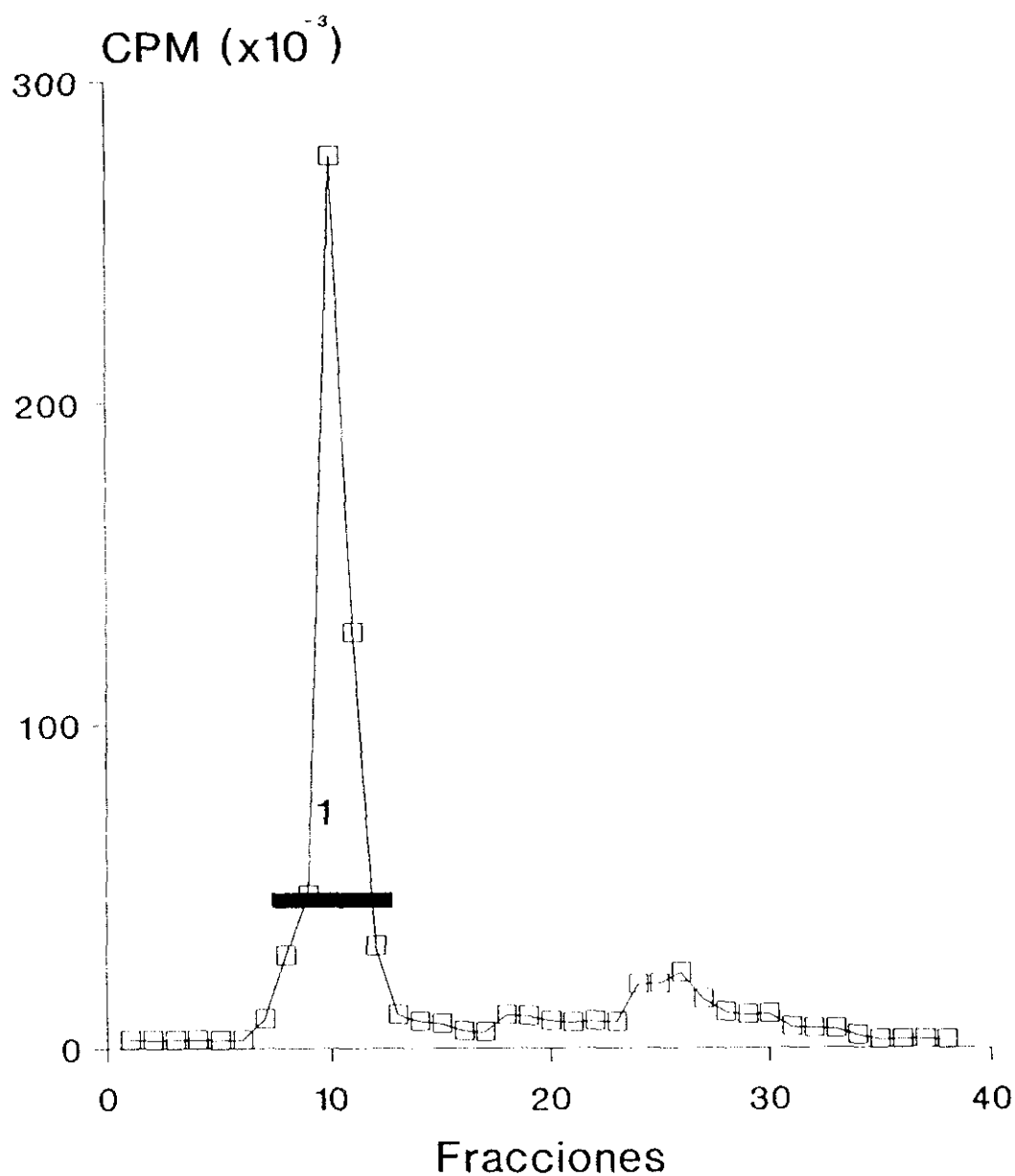


Fig.2.11. Purificación de ^{125}I - α -sarcosina

Tras el marcaje de la α -sarcosina con ^{125}I , por el método del Iodogen (443), la mezcla de reacción se cargó en una columna de Bio-Gel P-6DG de 0.6 cm x 22 cm (6 ml), equilibrada en tampón PBS, con BSA al 0.1% p/v, según se describe en el apartado 2.8.1.1.. El pico que eluyó de la columna en volumen excluido contenía la proteína marcada [1].

aparte. A dichas fracciones se les añadió BSA al 1% p/v y se distribuyeron en alícuotas de 150 µl, que se mantuvieron congeladas a -20 °C. La proteína marcada presentó una actividad específica de 4.14 µCi/µg.

Dependiendo de cada experimento, las muestras de toxina marcada fueron diluidas en tampón PBS o con una solución de toxina fría con el fin de obtener la actividad específica deseada.

2.8.1.2. Marcaje de los anticuerpos monoclonales y policlonales con ^{125}I

2.8.1.2.1. Marcaje por el método de la cloramina T

El anticuerpo de cabra contra el Fc de las inmunoglobulinas IgG de ratón, denominado α -7S (Cappel Laboratories, Inc., Downingtown, PA, USA) y los anticuerpos de conejo contra la mitogillina y contra la α -sarcina, purificados por proteína A-Sepharosa, fueron marcados con ^{125}I Na (Amersham, International Ltd., Amersham, Bucks, Inglaterra,) por el método de la cloramina T, descrito por Greenwood y col (444).

En este método, las muestras fueron disueltas en 60 µl de tampón 0.1 M fosfato sódico, pH 7.4, a los que se añadió 0.3 mCi de ^{125}I Na. El marcaje comenzó cuando se añadieron 10 µl de una solución de cloramina T a 1 mg/ml, en agua destilada y finalizó 30 minutos después con la adición de 100 µl de una solución de metabisulfito sódico a una concentración de 3 mg/ml en tampón fosfato, que detiene la reacción.

La proteína marcada fue purificada a partir de la mezcla de reacción con una columna de Bio-Gel P-6DG, similar a la descrita para el marcaje con Iodogen (ver apartado 2.8.1.1.).

2.8.1.2.2. Marcaje por el método de la lactoperoxidasa

Los demás anticuerpos monoclonales fueron marcados por el método del Iodogen, tal como ha sido descrito para las toxinas en el apartado anterior, o por el método de la lactoperoxidasa, según el método de Hubbard y Cohn (445), que se describe a continuación.

Para llevar a cabo la reacción de marcaje, se partió de una solución de 50 µg de AcMo, a la que se añadió 1 mCi de ^{125}I Na (Amersham International), 3 µg de lactoperoxidasa (Calbiochem-Boehringer, La Jolla, CA, USA) y 10 µl de 0.003% de agua oxigenada (H_2O_2) v/v (Merck). La mezcla se incubó durante 10 minutos y la reacción se terminó con la filtración de la misma en una columna de Bio-Gel P-6DG de 0.6 cm x 22 cm (6 ml) equilibrada en tampón PBS con BSA al 0.1% p/v.

2.8.2. Técnicas de Radioinmunoensayo

2.8.2.1. Determinación de la concentración de α -sarcina

2.8.2.1.1. Obtención de la recta patrón de inhibición de fijación de ^{125}I - α -sarcina con α -sarcina fría

Esta técnica de radioinmunoensayo fue utilizada para determinar la concentración de α -sarcina en los medios de cultivo del *Aspergillus giganteus* MDH 18894. Para la puesta a punto del método, se realizó la curva de inhibición de la fijación de ^{125}I - α -sarcina con distintas cantidades de α -sarcina fría.

En primer lugar, la α -sarcina se marcó con ^{125}I utilizando el método del Iodogen descrito por Fraker y Speck (443), con una actividad específica de 0.45 $\mu\text{Ci}/\text{pmol}$ (ver apartado 2.8.1.1.).

Con el fin de aumentar la fijación de IgG específica anti α -sarcina a placas de polivinilcloruro (96 pocillos, Costar Europe Ltd., Badhoevedorp, Holanda), los pocillos se incubaron con 125 μl de una solución de glutaraldehído (Sigma) al 5% v/v en tampón 0.2 M fosfato sódico, pH 8.25, durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, los pocillos se lavaron con 200 μl del mismo tampón.

Posteriormente, en cada pocillo se añadieron 125 μl de una solución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG específica contra α -sarcina (ver apartado 2.5.2.2.) en tampón 0.2 M fosfato sódico pH 8.25, que se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Tras retirar la solución de IgG, los pocillos se cubrieron con 200 μl de una solución 5 mg/ml de BSA (Sigma) disuelta en el mismo tampón, que se mantuvo durante 5 minutos, al cabo de los cuales, los pocillos se lavaron 3 veces consecutivas con 200 μl de tampón PBS pH 7.4, con 0.1 mg/ml de BSA.

En los pocillos se añadieron 100 μl de una solución de α -sarcina a distintas concentraciones, comprendidas entre 0.5 μg y 34 pg , que contenían una alícuota de ^{125}I - α -sarcina a razón de 100.000 cpm por pocillo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron 3 veces con 200 μl de PBS pH 7.4, 0.1 mg/ml BSA. Posteriormente, se añadieron en cada pocillo 225 μl de una solución 2 M NaOH que se mantuvo durante 10 minutos y se contaron 200 μl de dicha solución durante 1 minuto en un contador de centelleo sólido (Packard modelo 5440).

Para determinar la fijación inespecífica de la radiactividad a las placas, tres pocillos de cada placa en los que no se había fijado IgG específica se procesaron de igual forma a la descrita, y para determinar la fijación inespecífica de los medios de cultivo a otras inmunoglobulinas, se utilizó una muestra de IgG específica contra la ricina que se procesó también de igual forma.

En la figura 2.12. aparece la curva de la inhibición de la fijación de α -sarcina marcada por α -sarcina fría. La ecuación de la recta se calculó por regresión lineal de los datos experimen-

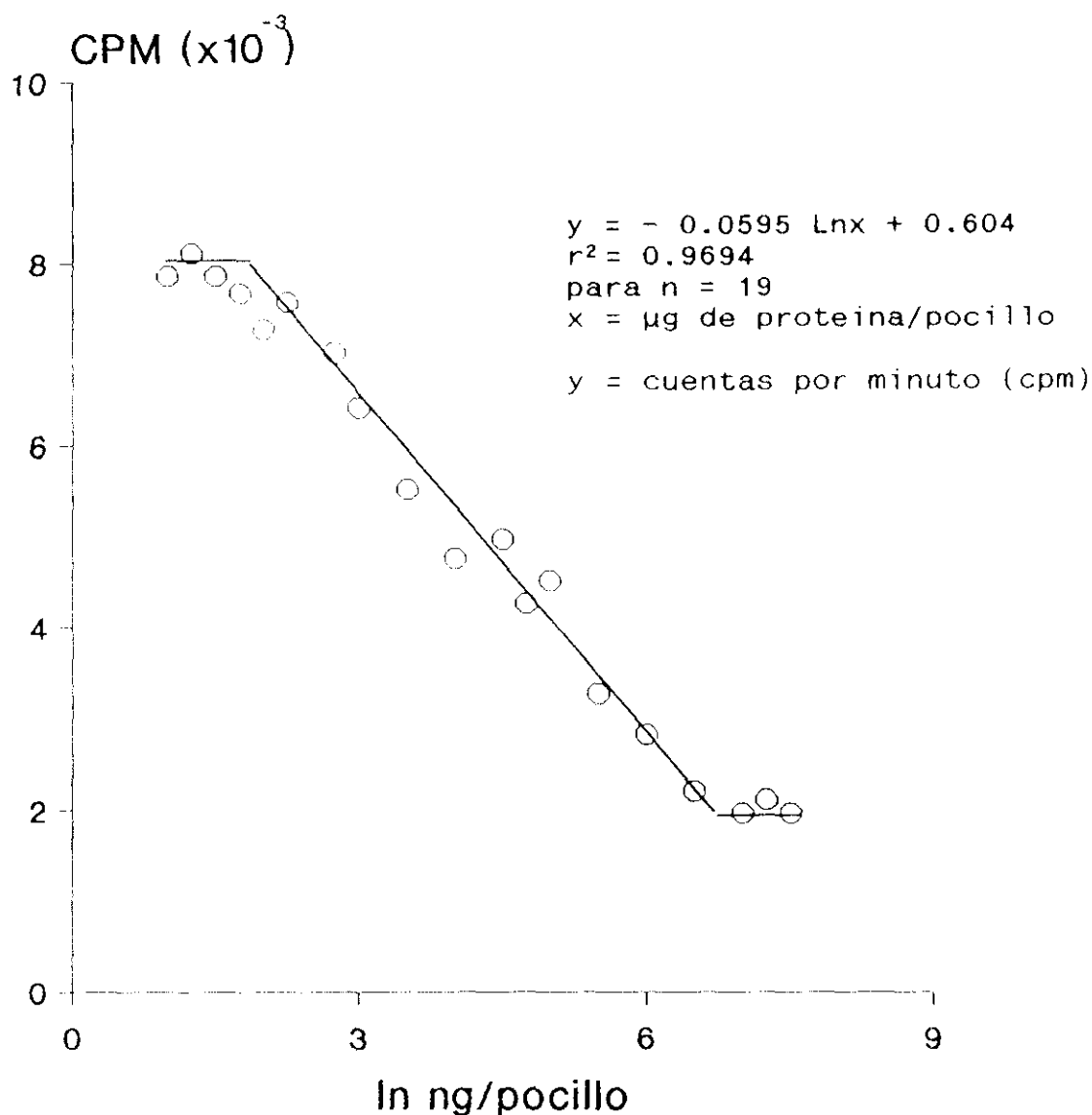


Figura 2.12. Curva de inhibición de la fijación de ^{125}I - α -sarcina por α -sarcina fría.

En la gráfica se recoge la curva de inhibición de la fijación de α -sarcina marcada con yodo a pocillos incubados con IgG específica contra la proteína, con distintas cantidades de α -sarcina fría. La fórmula de la curva se incluye así mismo en la figura. Esta curva patrón fue utilizada en la valoración de las concentraciones de proteína en los distintos medios de cultivo (apartado 2.8.2.1.2). El procedimiento de obtención de los valores representados se describe en el apartado 2.8.2.1.1.

En el eje X se representa el logaritmo neperiano de la concentración de α -sarcina fría por pocillo expresada en ng y en el eje Y, el número de cuentas por minuto (cpm) obtenidas en cada pocillo.

tales.

2.8.2.1.2. Determinación de la concentración de α -sarcina en los medios de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

Para la detección de la cantidad de α -sarcina en los medios de cultivo en los pocillos, incubados previamente con IgG anti α -sarcina, se añadieron 150 μ l de una mezcla de las muestras de los medios de cultivo y de ^{125}I - α -sarcina, a razón de 100.000 cpm por pocillo. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con tampón PBS con BSA a una concentración de 0.1 mg/ml y, tras tratar los pocillos con una solución 2 M NaOH, se contaron en un contador gamma.

Los valores de concentración de α -sarcina en los medios se obtuvieron por interpolación en la recta obtenida a partir del experimento de inhibición de fijación de α -sarcina marcada con α -sarcina fría (ver figura 2.12.)

2.8.2.2. Técnicas de radioinmunoensayo en fase sólida

Esta técnica se realizó en placas de 96 pocillos de Costar, según describen Ménard y col (12) y fue utilizada en los experimentos de fijación de las distintas fracciones de las inmunotoxinas a las líneas celulares, en los experimentos de competición y en los experimentos realizados con soluciones de proteínas purificadas.

2.8.2.2.1. Radioinmunoensayo sobre células

Cuando el experimento se llevó a cabo sobre células, éstas se sembraron en las placas y se dejaron crecer hasta que todos los pocillos alcanzaron un crecimiento en monocapa.

Después, las células fueron fijadas a los pocillos con 0.2% v/v de glutaraldehído (Sigma), según se describe en el apartado 2.9.4 y lavadas con solución salina balanceada de Hanks (Sigma), o se conservaron a 4°C en PBS tampón fosfato salino (0.136 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.008 M Na_2HPO_4 , 0.0015 M KH_2PO_4 , 0.0009 M CaCl_2 , 0.0005M MgCl_2 pH 7.4) con 2% v/v de SFT y 0.01% p/v de azida sódica, antes de iniciarse el experimento.

A cada pocillo, se le añadieron 50 μ l de las distintas diluciones de la solución de proteínas, realizando triplicados para cada una de las muestras y las placas se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido dicho tiempo, los pocillos fueron lavados dos veces consecutivas con 200 μ l de PBS, tras lo cual se añadieron en cada pocillo 50 μ l de medio de cultivo RPMI 1460 que contenía entre 50.000 cpm y 100.000 cpm de ^{125}I -IgG-anti-7S (Cappel Laboratories, Downingtown, PA., USA.) que reconoce específicamente a las inmunoglobulinas de ratón, o de ^{125}I -IgG-anti- α -sarcina o anti-mitogillina, obtenidos en el laboratorio según se describe en el apartado 2.5.1.1. y 2.5.1.2., respectivamente. Las placas se incubaron durante otros 45 minutos a temperatura

ambiente.

Después de la incubación con el antisuero marcado, los pocillos se lavaron 5 veces consecutivas con PBS, tras lo cual, en cada uno de ellos, se añadieron 100 µl de una solución de NaOH 2 M que se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente. El contenido de cada pocillo se contó en un contador gamma. Los resultados obtenidos se representaron como número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos frente a µg de proteína.

2.8.2.2.2. Radioinmunoensayo sobre proteínas

Esta técnica de radioinmunoensayo se utilizó en los experimentos de valoración de la inmunogenicidad de las toxinas inoculadas en ratones Balb/c, según se describe en el apartado 2.5.3.

El experimento se llevó a cabo, así mismo, en placas de 96 pocillos, en las que se añadieron entre 1 y 5 µg de proteína en 100 µl de PBS por pocillo. Las muestras de proteína fueron fijadas a los pocillos con una solución de glutaraldehído al 0.2% v/v (ver apartado 2.9.4.). Finalizado el proceso de fijación, los pocillos se lavaron con PBS.

En cada pocillo se añadieron 50 µl de diluciones sucesivas de los antisueros de los ratones inmunizados, entre proporciones 1:25 y 1:625, que se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Como controles negativos de inmunización se utilizaron, respectivamente, el suero de ratones inoculados con otro antígeno no relacionado o el suero de animales no inoculados, que fueron diluidos y procesados de igual forma. Todas las muestras se aplicaron por triplicado.

Tras la incubación, el experimento se desarrolló de igual forma a la descrita en el apartado anterior para los radioinmunoensayos realizados sobre líneas celulares en cultivo, incubando las muestras con 100.000 cuentas por pocillo de ^{125}I -IgG-anti-7S (Cappel Laboratories, Downingtown, PA.).

Los resultados obtenidos se expresaron como Índices de Unión de las diluciones de suero 1:100, para los animales inmunizados según el método 1 y 1:125, para los que lo fueron según el método 2 (ver apartado 2.5.3.1.). El Índice de Unión fue definido como la media del número de cuentas por minuto obtenida de los 3 replicados, dividida por la media del número de cuentas por minuto obtenidos en los 3 controles negativos.

Puesto que cuando se utilizaron sueros de animales no inmunizados o no relacionados con el antígeno, no se obtuvieron nunca Índices de Unión superiores a 3, los valores que resultaron ser iguales o superiores a este número, fueron considerados como positivos.

2.9. Técnicas de cultivos celulares

2.9.1. Cultivo de las líneas celulares

2.9.1.1. Condiciones y medio de cultivo

Las líneas fueron crecidas en frascos de cultivo estériles de plástico (Nunc, Roskilde, Dinamarca) de 25 cm², 75 cm² y 150 cm² de superficie o en placas de 96 pocillos, 36 pocillos y 24 pocillos (Costar, Europe Ltd, Badhoevedorp, Holanda), según el tipo de experimento realizado.

El cultivo de las células se realizó en medio de cultivo del "Roswell Park Memorial Institute", RPMI 1460 (Flow, Virginia, USA y Microbiologies Associates Walkersville, MD, USA) con un 10% de suero fetal de ternera (STF) (Flow) descomplementado por tratamiento a 56°C durante 30 min. Los medios se completaron con 2 mM glutamina (Sigma), y los antibióticos penicilina a razón de 100 IU/ml y estreptomycin, a razón de 100 µg/ml, a partir de una solución única de Flow; ocasionalmente, se utilizó anfotericina B, a una concentración de 2.5 µg/ml, para evitar contaminaciones por hongos y levaduras. Las células fueron controladas, periódicamente, por microscopía electrónica para comprobar la ausencia de contaminación por micoplasma.

Cualquier manipulación de las líneas celulares se realizó en una cámara de flujo laminar vertical (Gelaire) y se crecieron en un incubador de CO₂ de Flow, modelo estándar, con una concentración del 5% v/v de CO₂ y una temperatura de 37°C.

2.9.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

El medio de cultivo se renovaba regularmente cada 2 días y se controlaba diariamente el crecimiento de las células y la ausencia de contaminaciones de origen microbiano, con un microscopio invertido de contraste de fases modelo Diaphot de Nikon (Nippon Kogaku, K.K., Tokyo, Japón, distribuido en España por Rego y Cia. S.S. Madrid).

Los subcultivos de las líneas celulares se realizaron a partir de cultivos realizados en frascos estériles, por tripsinización de las células, según se describe a continuación, antes de que las monocapas alcanzaran la confluencia. Las células tratadas con tripsina eran contadas y divididas en alícuotas que eran trasplantadas a nuevos frascos de cultivo con medio de cultivo completo.

A las 24 horas de transferir las células a nuevos recipientes, se cambió el medio de cultivo para eliminar aquellas que no se habían adherido a la superficie del recipiente. Después, se continuó el cultivo en las condiciones habituales.

En los casos en los que las células habían de ser fijadas con glutaraldehído a los pocillos de las placas, el cultivo se prolongó hasta que la monocapa de célula ocupaba por completo la superficie del pocillo.

2.9.2. Tripsinización de las líneas celulares

La tripsinización de los cultivos celulares crecidos en frascos de 25 cm² de superficie (Costar) se llevó a cabo tras eliminar el medio de cultivo, añadiendo 2 ml de una solución de tripsina 0.05% p/v en tampón PBS con un 0.02% EDTA p/v (Flow) para lavar las células; esta operación se repitió dos veces, eliminando cada vez la solución de tripsina. Posteriormente, se añadió 1 ml de la solución de tripsina/EDTA y las células se pusieron en el incubador de CO₂ a 37°C, durante 3 ó 4 minutos.

Transcurrido dicho tiempo, se aseguró el completo desprendimiento de la monocapa de células al microscopio de fase invertida y se añadió 1 ml de RPMI 1640, 10% STF para neutralizar la actividad de la tripsina. Inmediatamente, las células fueron transferidas a un tubo estéril de 10 ml y centrifugadas durante 5 minutos a 200 g a 5°C en una centrífuga de mesa Vismara modelo 438 (Milán, Italia) o en una centrífuga DAMON DPR-6000 (Massachusetts, USA). El sedimento de la centrifugación, donde se encuentran las células, se resuspendió en 5 ml de medio completo.

Una alícuota de las células resuspendidas en dicho volumen de medio, fueron contadas en una cámara para contar células, tras la adición de 0.5 % v/v de colorante Tripán Blue.

Este método de tripsinización permitió disponer de células en suspensión con las que se realizaron los experimentos de internalización de anticuerpos monoclonales en las células diana, para la incubación con la toxina o con las inmunotoxinas en los experimentos de inhibición del desarrollo de tumores en animales, etc. También fue siempre un paso previo a la siembra de células en placas de cultivo.

2.9.3. Siembra de células en placas

Finalizada la tripsinización, las células se diluyeron con medio completo en relación 1:20. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Costar) se depositó con ayuda de una pipeta multidispensadora Eppendorf multipette 4780 (Eppendorf Geratebau Netheler-Hinz GmbH, Hamburgo, Alemania), una alícuota de 200 µl que contenía el número de células apropiado según la línea celular y el experimento que se desea realizar. En las placas de 6 pocillos (Costar) con 35 mm de diámetro, se sembraron las células en 2 ml de medio de cultivo.

El número de células sembradas por pocillo para las placas de 96 pocillos, osciló entre 20.000 y 40.000, en los experimentos de inhibición de síntesis de proteínas llevados a cabo, y entre 20.000 y 150.000 para los experimentos de inhibición de la proliferación celular. Estos valores, considerados como óptimos, habían sido calculados previamente para cada una de las líneas celulares.

2.9.4. Fijación de las células a placas con glutaraldehído

La fijación de células a placas con glutaraldehído se llevó

a cabo en células crecidas en placas de 96 pocillos.

Antes de proceder a la fijación, resultó necesario asegurarse de que la monocapa de células era continua y ocupaba la superficie total del pocillo, por tanto, las células eran sembradas con varios días de antelación.

En primer lugar, se procedió a eliminar el medio de cultivo con ayuda de una pipeta multicanal. En cada pocillo se añadieron 100 μ l de una solución de glutaraldehído 0.2% v/v en tampón 0.02 M fosfato sódico, pH 7.4, 0.14 M NaCl y se dejó reaccionar durante 5 minutos.

Transcurrido dicho tiempo, la solución de glutaraldehído se retiró de los pocillos con ayuda de un aspirador conectado a una bomba de vacío, intentando no dañar la monocapa de células fijada. Los pocillos se lavaron con 200 μ l de tampón PBS. Esta operación se repitió 5 veces, para asegurarse de que no quedaban restos de glutaraldehído.

Seguidamente, se añadieron 200 μ l de una solución de glicocola al 0.75% p/v (Carlo Erba) en tampón PBS, para bloquear los posibles sitios reactivos del plástico de la placa. Esta solución de glicocola se mantuvo durante 5 minutos, transcurridos los cuales se eliminó con ayuda de un aspirador y se procedió a lavar repetidamente las células con PBS.

Finalizado el proceso, las células fijadas con glutaraldehído se conservaron en tampón PBS con BSA al 0.1% v/v.

2.9.5. Técnica de recuento del número de células

El recuento de las líneas celulares se llevó a cabo a partir de una alícuota de las células tripsinizadas y resuspendidas en el medio de cultivo.

Para ello, a la alícuota de células se le añadió colorante Tripán Blue (Sigma) a una concentración final de 0.5 % v/v, y la mezcla se dispuso en una cámara para contar células.

La cámara fue llevada al microscopio óptico y se contó el número de células presente en al menos 4 de las cuadrículas en las que esta se divide, a partir de la cual se calculó el número total de células presentes en la suspensión de partida, teniendo en cuenta que el volumen de la cámara es de 0.01 cm^3 .

2.9.6. Conservación de las líneas celulares

Las líneas celulares se conservaron congeladas en nitrógeno líquido por períodos de tiempo largos, o bien a -80°C en un congelador Ultra Low (Revco, W. Columbia, USA) por períodos de tiempo cortos.

Después de tratar las monocapas con tripsina y contar el número de células siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, se ajustó su concentración a 2×10^6 células por ml, utilizando el medio de cultivo habitual y se añadió a la

suspensión obtenida un 10% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO de Sigma) como agente crioprotector (446). La suspensión se dividió en alícuotas de 1 ml que fueron distribuidas en ampollas de plástico estériles (Flow) y colocadas en cajas de poliestireno expandido de aproximadamente 5 cm de espesor. Las cajas se introdujeron a su vez en un congelador a -80°C . De esta forma, se consigue un descenso gradual de la temperatura, aproximadamente 1 grado por minuto.

Transcurridas 18 horas, los viales de congelación se introdujeron en contenedores de nitrógeno líquido. Estas células ha de ser descongeladas y crecidas al menos una vez al año.

Al descongelar las células es muy importante, para conseguir una buena viabilidad de las mismas, que el proceso sea lo más rápido posible. Por ello, las ampollas sacadas del nitrógeno líquido o del congelador de -80°C , se sumergieron inmediatamente en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 2 minutos. Al cabo de este tiempo el contenido de las ampollas se diluyó al menos 10 veces con medio fresco, para disminuir la concentración de DMSO, y las células se cultivaron durante 24 horas de la manera habitual. Finalmente, se cambió el medio de cultivo para eliminar por completo el DMSO y las células no viables.

2.10. Estudios de actividad *in vitro*

2.10.1. Actividad en sistemas acelulares

2.10.1.1. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistemas libres de células

Los experimentos de determinación de la actividad de inhibición de la síntesis de proteínas en un sistema libre de células de las toxinas y otras fracciones estudiadas, fueron llevados a cabo en lisado de reticulocitos de conejo obtenido a partir de la casa comercial Boehringer Mannheim GmbH (Alemania), en el que se determina la capacidad del sistema para llevar a cabo la traducción de un ARNm en presencia o ausencia de las muestras. Como ARN mensajero patrón, se utilizó el ARNm del virus del mosaico del tabaco, purificado por Amersham International Ltd.

Este sistema está basado en la técnica de Krawetz y col (447) y en él se reproducen los distintos pasos de la síntesis de proteínas: iniciación, elongación y terminación.

Básicamente, la reacción necesita de los siguientes reactivos: todos los aminoácidos, excepto la leucina, a una concentración de $312.5\text{ }\mu\text{M}$ por aminoácido en tampón 0.25 M Hepes, pH 7.6, 2.5 M acetato potásico, 0.025 M acetato magnésico, 0.0375 M fructosa-1,6 difosfato, 0.030 M AMPc, 0.0125 M ATP; 0.025 M GTP, 0.1 M fosfato de creatina, 0.00625 M espermidina y 0.025 M ditiotreitol. De esta solución se tomaron $48\text{ }\mu\text{l}$, a los que se añadió una solución de inhibidor de la actividad ARNasa y $120\text{ }\mu\text{l}$ de una solución de L-(5- ^3H)-Leucina con 5 mCi/ml (Amersham International Ltd.).

A la mezcla se le añadieron $240\text{ }\mu\text{l}$ de la solución de lisado

de reticulocitos que contenía, por cada 200 μ l, 125 μ g/ml de ARNt de hígado de ternera, 40 μ g/ml de hemina, 0.002 M EGTA y 50 U/ml de creatina kinasa.

De esta forma, el volumen total de la reacción fue de 400 μ l, de los cuales se pusieron, en tubos de Eppendorf de 2 ml, 40 μ l por tubos y 5 μ l de cada una de las concentraciones de proteína en las que se deseaba comprobar la capacidad de inhibición de la síntesis protéica. Cuando el experimento se llevó a cabo en condiciones reductoras, se añadió un 5% v/v de 2- β -mercaptoetanol.

En todos los tubos se añadieron 5 μ l de ARNm del virus del mosaico del tabaco, excepto en los controles de fijación inespecífica de radiactividad, a partir de una muestra de concentración 200 μ g/ml, en tampón 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.001 M EDTA, lo que supone 1 μ g de ARNm por tubo de reacción.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 0, 30, 60 y 90 minutos, para cada una de las concentraciones. Al final de cada tiempo, se tomaron muestras de 3 μ l por duplicado, que fueron depositadas sobre tiras de papel de 1 cm x 5 cm de papel Whatman 3MM.

Las tiras de papel fueron lavadas con una solución de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma) al 10% p/v en agua destilada, durante 10 minutos, y hervidas durante 15 minutos en la misma solución de TCA. Transcurrido dicho tiempo, se mantuvieron en hielo y se lavaron, en primer lugar con etanol concentrado y después con acetona, ambos productos obtenidos de Merck. Tras los dos lavados, las tiras se dejaron secar al aire y se contaron en un contador de centelleo, tras añadir 3 ml de líquido de centelleo específico para muestras sólidas.

El número de cuentas por minuto incorporadas por pocillo, cuando la síntesis de proteínas se llevó a cabo sin ningún inhibidor, osciló entre 20.000 cpm y 40.000 cpm.

2.10.1.2. Determinación de la actividad ribonucleasa de la α -sarcina sobre polímeros sintéticos

Esta determinación está basada en la técnica descrita por Kamagai y col (448) y utilizado por Endo y col (205), quienes comprobaron que la α -sarcina es capaz de hidrolizar polímeros sintéticos de las bases incluidas en los ácidos nucleicos.

En este caso se utilizaron distintos homopolímeros y heteropolímeros de bases nitrogenadas obtenidos de la casa comercial Sigma, que fueron resuspendidos a razón de 50 μ g por 100 μ l en tampón 0.05 M Tris-HCl pH 7.5.

En cada tubo se añadieron cantidades decrecientes de α -sarcina o de BSA como control negativo de digestión, entre 50 y 0.78 μ g de proteína en un volumen de 25 μ l. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C, en un baño termostatzado.

Para parar la reacción, se añadieron a cada tubo, 100 μ l de una solución de ácido perclórico al 5% p/v (Merck), uranil acetato al 0.25% p/v (Sigma) en agua destilada, tras lo cual los

tubos se mantuvieron el hielo durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron en una centrífuga de mesa marca Beckman, modelo 152 microfuga, durante 3 minutos, tras lo cual, los sobrenadantes se diluyeron en proporción 1:5 v/v con agua destilada y en las diluciones se determinó la absorción a 260 nm. En cada caso, a los valores obtenidos, se les restó el valor de densidad óptica del control en el que no había sido añadida ninguna muestra de proteína y los resultados finales se expresaron como incremento de la densidad óptica a 260 nm.

2.10.2. Actividad en líneas celulares en cultivo

2.10.2.1. Cuantificación de la internalización de los complejos anticuerpo monoclonal-antígeno

El porcentaje de internalización de los AcMos en las distintas líneas celulares, fue determinado a través de una modificación del método descrito por Matzku y col (294).

El experimento se realizó paralelamente sobre células vivas y sobre células fijadas con una solución al 0.5 % v/v de glutaraldehído, de la misma línea celular. En ambos casos, se partió de dos alícuotas de 1.5 ml de medio de cultivo completo con aproximadamente 1.000.000 de células por ml, que fueron mantenidas a 0°C y a 37°C, respectivamente.

Por tanto, la alícuotas utilizadas en los experimentos fueron cuatro: células vivas a 0°C, células vivas a 37°C, células fijadas a 0°C y células fijadas a 37°C.

En todos los casos se añadieron 200 µl de ¹²⁵I-anticuerpo monoclonal en medio de cultivo RPMI 1460 con 10% v/v de SFT, marcado con el método de la lactoperoxidasa, a razón de 25.000 cpm/µl (445), lo que supone un total de 500.000 cpm.

A los tiempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos después de iniciada la incubación con el AcMo marcado con ¹²⁵I, se extrajeron muestras de 200 µl por duplicado de cada una de las alícuotas, que fueron diluidas con medio de cultivo y lavadas dos veces por centrifugación.

El sedimento obtenido en la segunda centrifugación, que contenía las células, fue resuspendido y contado en un contador gamma (marca Packard, modelo Cristal II). El número de cuentas por minuto obtenido se consideró como la porción de AcMo unido a la célula. El porcentaje de unión se calculó con respecto al total de la radiactividad puesta en el pocillo, considerando las 500.000 cpm originales como el valor 100%. Este valor se designó como el porcentaje de radiactividad total [1]:

$$[1] \text{ \% radiactividad total} = \frac{\text{cpm unidas a células}}{\text{cpm totales}} \times 100$$

Este cálculo fue realizado para las cuatro alícuotas indicadas anteriormente.

Tras el conteo, las células fueron incubadas en tampón 0.05 M glicocola-HCl, pH 2.8, 0.1 M NaCl, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron con medio completo por centrifugación y el sedimento obtenido, que contenía las células, se contó nuevamente en un contador gamma. El número de cuentas obtenido se consideró como el porcentaje de AcMo que se mantiene unido a las células tras el tratamiento a pH 2.8. El porcentaje de radiactividad residual se calculó de la siguiente forma [2]:

$$[2] \text{ \% radiactividad residual} = \frac{\text{cpm unidas a células tras el tratamiento con pH 2.8}}{\text{cpm totales}} \times \text{unido a células}$$

Este cálculo se realizó para todas las alícuotas: células vivas a 0°C, células vivas a 37°C, células fijadas a 0°C y células fijadas a 37°C.

El porcentaje de internalización se determinó estudiando comparativamente los porcentajes de fijación obtenidos en cada uno de los tratamientos considerando, en cada caso, los valores residuales observados. Los cálculos fueron realizados según las fórmulas [3],[4],[5] y [6], que se recogen a continuación:

$$[3] \text{ \% de fijación} = [1] - [2]$$

Este cálculo se realizó para las alícuotas siguientes: células vivas a 0°C, células vivas a 37°C, células fijadas a 0°C y células fijadas a 37°C.

$$[4] \text{ \% de fijación a células vivas} = \% \text{ de fijación a } 37^{\circ}\text{C} - \% \text{ de fijación a } 0^{\circ}\text{C}$$

$$[5] \text{ \% de fijación a células fijadas} = \% \text{ de fijación a } 37^{\circ}\text{C} - \% \text{ de fijación a } 0^{\circ}\text{C}$$

y, por último:

$$[6] \text{ \% de internalización} = [4] - [5]$$

2.10.2.2. Estudios de competición sobre células entre anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas

La especificidad de la interacción del AcMo MBr 1 y de MBr1-restrictocina con la línea celular MCF 7 fue determinada por medio de dos experimentos de radioinmunoensayo:

A) Estudios de competición de unión directa: en este experimento las células de la línea MCF-7 se incubaron con distintas diluciones de las fracciones MBr 1-PDP, MBr 1-Res, MOv 2 y MOv 2-PDP, comprendidas entre 0.5×10^{-6} M y 1×10^{-9} M, en presencia de una concentración de 0.1 nM de MBr 1 marcado con ^{125}I . La incubación se llevó a cabo durante 3 horas, a 37°C .

B) Estudios de competición de unión indirecta: en este caso se incubaron células de la línea MCF7 con concentraciones similares a las especificadas en el párrafo anterior de las fracciones MBr 1-PDP, MBr 1-Res, MOv 2 y MOv 2-PDP con una concentración de 10 nM de MBr 1-Res no marcado, durante 3 horas a 37°C . Transcurrido dicho periodo de tiempo, las células fueron lavadas y se incubaron con IgG específica contra la α -sarcina marcada con ^{125}I , durante 45 minutos a 37°C .

El procedimiento de marcaje de los antisueros utilizados en estos experimentos se describen en el apartado 2.8.1.2. y las técnicas de radioinmunoensayo en el apartado 2.8.2.2.

2.10.2.3. Determinación de la citotoxicidad

2.10.2.3.1. Inhibición de la síntesis de proteínas

La valoración de la citotoxicidad de las distintas fracciones se llevó a cabo en experimentos de inhibición de la síntesis de proteínas sobre cultivos celulares de las distintas líneas tumorales humanas, sembradas a razón de entre 25.000 a 40.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) según el método descrito por Canevari y col (332).

Antes de iniciar el experimento, las placas se mantuvieron durante 3 horas en el incubador de CO_2 a 37°C .

A partir de las muestras de proteína iniciales a una concentración de 1×10^{-4} M, se hicieron entre 4 y 6 diluciones sucesivas por cada una de ellas con RPMI 1460, 10% v/v STF. Estas diluciones fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro Millex de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore U.K., Harrow, Middx), saturado con 1 ml de medio de cultivo.

Estas muestras de proteínas fueron añadidas sobre las células a razón de 100 μl por pocillo, haciendo triplicados de cada una de las diluciones. Como control positivo de la síntesis de proteínas, se utilizaron 6 pocillos en los que se añadieron 100 μl de medio de cultivo completo sin muestra adicional. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar.

Las placas fueron incubadas durante 20 horas a 37°C en incubador con una concentración de 5% de CO_2 . Transcurrido dicho tiempo, se eliminaron los sobrenadantes de las células y en cada

pocillo, se añadieron 200 µl de RPMI 1460 con 1 µCi de L-(5-³H)-prolina (Amersham International Ltd.).

La muestra inicial de prolina tritiada fue previamente esterilizada por filtración a través de un filtro Millex de 0.22 µm (Millipore U.K.). Como control de la fijación inespecífica de la prolina a los pocillo, una cantidad equivalente de radiactividad se dispuso en 6 de ellos, que después se procesaron de igual forma que aquellos que contenían las células.

Las células se incubaron con la prolina tritiada durante 18 horas, al cabo de las cuales, se eliminó el sobrenadante y los pocillos se lavaron 5 veces con 200 µl por vez de tampón PBS, 0.0001 % p/v de rojo fenol (Sigma). Tras el lavado, se añadieron 200 µl por pocillo de una solución al 1% v/v de detergente Nonidet P40 (NP40) obtenido de B.D.H. (Poole, Dorset), en tampón PBS estéril. El detergente se mantuvo durante 60 minutos a 4°C, con el fin de conseguir la completa disolución de las membranas celulares.

Para finalizar, se tomaron 100 µl de cada pocillo a los que se añadieron 3 ml de líquido de centelleo Pico-Fluor TM¹⁵ (Packard), y se contaron en un contador de centello líquido marca Beckman modelo LS1801 (Beckman Analytical S.p.A., Fullerton, CA. USA).

El número de cuentas por minuto incorporados por las células, osciló entre las 16.000 cpm y las 40.000 cpm, mientras que los controles negativos no sobrepasaron las 2.000 cuentas por minuto.

Los valores de radiactividad obtenidos fueron representados como porcentaje de inhibición de síntesis de proteínas, considerando como valor 100% de radiactividad incorporado el número de cuentas por minuto observado en las células utilizadas como control positivo.

En los casos en que las concentraciones de toxina o de inmunotoxinas utilizadas, permitieron alcanzar un porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas superior al 50%, se consideró el valor IC₅₀, o concentración molar de proteína capaz de inhibir el 50% de la síntesis de proteínas.

2.10.2.3.2. Inhibición de la proliferación celular

La capacidad de inhibición de la proliferación celular de las muestras de proteína, se determinó según una modificación del método descrito por Masui y col (8).

Para ello, se sembraron en placas de 6 pocillos (Costar) de 35 mm entre 20.000 y 150.000 células por pocillo según la línea celular, en 2 ml de medio de cultivo y éstas se mantuvieron en el incubador. Al día siguiente a la siembra, se cambió el medio de cultivo y se añadieron de nuevo, 2 ml de medio completo, pero esta vez con las distintas diluciones de las muestras en las que se quiere comprobar la actividad de inhibición de la proliferación celular. Las diluciones ensayadas presentaban concentraciones entre 10⁻⁶ M y 10⁻¹² M.

Las células se cultivaron durante 5 días a 37 °C con una concentración de CO₂ del 5% v/v. Transcurrido dicho tiempo, los pocillos se trataron con tripsina-EDTA y se contó el número de células viables en una cámara para contar células, por tinción de una alícuota con una solución de Tripán Blue al 0.5% p/v en tampón PBS.

Los resultados obtenidos se representaron como porcentaje de células vivas tras el tratamiento para cada una de las concentraciones utilizadas, con respecto al número total de células en pocillos no tratados.

El tiempo de duplicación de cada una de las líneas celulares se determinó por recuento del número de células tras 5 días de crecimiento, con respecto al número inicial de células sembradas en el pocillo. El recuento se realizó también tras la tinción con Tripán Blue, como ha sido descrito en el párrafo anterior.

2.10.2.3.3. Potenciación de la acción de las inmunotoxinas con ionóforos y agentes iónicos

Las células de la línea MCF 7, sembradas a razón de 30.000 células por pocillo, se incubaron con restrictocina (10^{-6} M) y MBr 1-restrictocina (10^{-9} M), respectivamente, en presencia de concentraciones comprendidas entre 10 mM y 40 mM de NH₄Cl (Merck) y entre 10 nM y 500 nM de monensina (Sigma).

La actividad de inhibición de síntesis de proteínas en presencia de ambos agentes, se determinó según ha sido descrito en el apartado anterior, y los valores de IC₅₀ fueron comparados con los obtenidos cuando dichos agentes no se incluyen en el medio de cultivo.

2.11. Estudios de actividad *in vivo*

2.11.1. Estudios de toxicidad *in vivo* de las toxinas

La toxicidad *in vivo* de la ricina, su cadena A, la restrictocina y la briodina, se determinó en grupos de 3 ó 4 ratones Balb/c, entre 18 y 22 gramos de peso. Los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal con dosis comprendidas entre 0.02 y 5 µg para la ricina, y con 5 µg como dosis mínima para las demás toxinas y 300 µg de la cadena A de la ricina, 500 µg de restrictocina y 600 µg de briodina como dosis máximas, disueltas en PBS y en volúmenes no superiores a los 300 µl.

Tras la inyección, los animales se mantuvieron aislados hasta el momento de su muerte o durante 7 días, al cabo de los cuales fueron sacrificados.

2.11.2. Determinación de la Dosis Letal 50 (LD₅₀)

En el caso de la ricina, se calculó la Dosis Letal 50 (LD₅₀), que se define como la cantidad de proteína que es capaz

de causar la muerte a la mitad de los animales. El cálculo se realizó, según describe Lison (449).

Para ello, se inocularon por vía intraperitoneal, grupos de 3 ó 4 ratones Balb/c con dosis de proteína comprendidas entre 25 ng por ratón (aproximadamente 1 µg/kg de peso) y 3000 ng por ratón (120 µg/kg de peso). En cada grupo, se determinó el porcentaje de ratones que murieron antes de las 48 horas, y estos valores porcentuales fueron transformados en unidades de probabilidad según una distribución normal.

A partir de dichas unidades de probabilidad, que fueron considerados como valores y, y de los logaritmos decimales de las medias de las dosis inoculadas en los ratones, expresadas en µg/kg de ratón, y consideradas como valores x, se obtuvo por regresión lineal la ecuación de la recta de fórmula $y = bx - a$.

A continuación, se aplicó la fórmula [1]:

$$[1] \log ED_{50} = (5 - a)/b$$

donde a y b, son los valores de la recta obtenida, considerando que:

$$ED_{50} = LD_{50}$$

definidas como ED_{50} = dosis eficaz
 LD_{50} = dosis letal

se obtuvo en valor de LD_{50} , expresado en µg por ratón o por kg de peso.

Para calcular el error estándar, se recurrió al análisis estadístico de los valores de supervivencia obtenidos a través de la aplicación de la distribución estadística t de Student, con n-2 grados de libertad, siendo n el número de ratones inoculados, para $P = 0.05$, expresando el resultado con un intervalo de confianza del 95% y en µg por ratón o por kg de peso.

2.11.3. Biodistribución de las toxinas

2.11.3.1. Aclaramiento en plasma de la restrictocina y la ricina

Para llevar a cabo los experimentos de aclaramiento en sangre y acúmulo en tejidos de toxinas, se procedió a marcar alícuotas de restrictocina y de ricina total con ^{125}I utilizando el método de marcaje del Iodogen (443), con una actividad específica de 0.01 µCi/pmol para ambas proteínas.

Las alícuotas de las proteínas marcadas radiactivamente, fueron inoculadas por vía intravenosa en un vaso central de la oreja de conejos New Zealand blancos, de 2.5 Kg a 3 Kg de peso, a razón de 1 µCi a 1.5 µCi por animal, lo que suponía entre 5 µg y 6 µg de proteína. Durante el desarrollo del experimento, los animales se mantuvieron aislados en una jaula metabólica.

A distintos tiempo tras la inoculación, 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 12.0 y 24 horas, se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 1.2 ml de la vena colateral de la oreja opuesta en la que el animal había sido inoculado. Antes de que la sangre coagulase, se transfirió 1 ml a tubos de plástico de 3 ml, e inmediatamente se midió la radiactividad en un contador gamma. Cuando se produjo la retracción del coágulo, se procedió a separar el plasma del coágulo y ambas fracciones se contaron nuevamente por separado.

En todos los casos, se consideró como tiempo 0 el valor medio en minutos al que se realizó la primera extracción de sangre, que fue de 4.7 ± 1.3 minutos. El valor de radiactividad de esta primera muestra fue tomado como porcentaje total en sangre ó 100%, y los valores obtenidos para cada una de las muestras posteriores se representaron como porcentaje de radiactividad remanente con respecto a este valor inicial.

2.11.3.2. Determinación de los parámetros farmacológicos

El cálculo de los parámetros farmacológicos se realizó a partir de la representación logarítmica de los porcentajes de radiactividad remanente frente a los tiempo de inyección, según las fórmulas de farmacodinámica recogidas por Bochner y col (450). Los porcentajes fueron expresados en $\mu\text{g/ml}$ de sangre, teniendo en cuenta que los conejos habían sido inoculados con, aproximadamente 5 μg de proteína total.

Para ello, se consideró que el aclaramiento de las toxinas se ajustaba a un modelo farmacocinético de distribución bifásica (450), con una primera fase de distribución y una segunda fase de eliminación, descrito por la ecuación biexponencial [1]:

$$[1] \quad C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

donde C = concentración de proteína en plasma a tiempo t, expresado en unidades de concentración (ng/ml de sangre).

A y B = valores constantes que indican los puntos de corte de ambas ecuaciones exponenciales con el eje Y, expresados en unidades de concentración (ng/ml de sangre).

α y β = valores constantes que indican la razón distribución y de eliminación, respectivamente, expresado en unidades inversas de tiempo (h^{-1}).

Los tiempos de vida media de cada fase, fueron determinados según las siguientes fórmulas [2] y [3]:

$$[2] \quad t_{1/2\alpha} = \ln 2 / \alpha \quad \text{para la fase de distribución, y}$$

$$[3] \quad t_{1/2\beta} = \ln 2 / \beta \quad \text{para la fase de eliminación.}$$

Ambas magnitudes se expresan en unidades de tiempo (h).

El área bajo la curva se obtuvo según la siguiente ecuación, expresado en unidades de concentración por tiempo ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$) [4]:

$$[4] \quad \text{AUC}_{0-\infty} = A/\alpha + B/\beta$$

2.11.3.3. Distribución de ^{125}I -restrictocina en los órganos de conejos New Zeland

Otra de las determinaciones que se llevaron a cabo en los conejos inoculados con ^{125}I -restrictocina, fue la estimación de la cantidad de radiactividad acumulada en los distintos órganos y tejidos. Para ello, los conejos fueron sacrificados a la hora o las 24 horas de la inoculación de la toxina marcada, con una inyección de 0.5 mg de pentotal sódico (Abbott Laboratories, S.A., Madrid, Spain) por vía intravenosa.

Cuando los conejos murieron, se les diseccionó y se extrajeron muestras de los distintos órganos y tejidos. Las distintas muestras se limpiaron de restos de otros tejidos, se lavaron en PBS para eliminar el exceso de sangre y se distribuyeron en tubos de plástico de 10 ml, calculando, por diferencia, el número de gramos de tejido puestos en cada tubo.

Los tubos que contenían las muestras se contaron en un contador gamma, y los valores de radiactividad se representaron como porcentaje de la radiactividad residual por gramo de tejido.

2.11.4. Neutralización del desarrollo de tumores en ratones nu/nu Balb/c

Células de la línea tumoral MCF-7 fueron tratadas con tripsina-EDTA, lavadas, divididas en cuatro alícuotas y resuspendidas a razón de 500.000 células por mililitro de medio de cultivo completo. Tres de estas alícuotas fueron incubadas con una concentración 30 nM de MBri-Res, con 60 nM de restrictocina y con 30 nM de MBri, manteniendo la cuarta alícuota en medio de cultivo completo.

Las alícuotas se incubaron durante 3 horas a 37°C en el incubador de CO_2 , con agitación ocasional, tras lo cual se lavaron 3 veces por centrifugación con medio de cultivo. Una alícuota de células de cada tratamiento se usó para llevar a cabo experimentos de inhibición de síntesis de proteínas *in vitro*, según ha sido descrito en el apartado 2.10.2.3.2., sobre MCF 7.

Tras el lavado, cuatro grupos de 5 a 6 ratones nu/nu Balb/c fueron inoculados intraperitonealmente con 15.000.000 de células de cada tratamiento por animal. Después de la inyección, se controló el aumento de peso de los animales y del volumen abdominal. Cuando estuvieron moribundos, o 6 semanas después de la inyección, fueron sacrificados y se examinó en ellos el

RNasa (organismo)	especificidad	número de aminoácidos	peso molecular	ref.
BACTERIAS (procariotas)				
Ba o Barnasa (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	no específica G > A > pirimidina	110	12.400	255,256
Bi (<i>Bacillus intermedius</i>)	no específica G > A > pirimidina	109	12.200	255
St (<i>Streptomyces erythreus</i>)	G	101	11.360	255,256
Sa (<i>Streptomyces aureofaciens</i>)	G	95	10.554	256
Pbi (<i>Penicilium brevicompactum</i>)	G	102	11.000	256
HONGOS (eucariotas)				
T1 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	G	104	11.110	255,256
C2 (<i>Aspergillus clavatus</i>)	G	102	10.650	255,256
Ms (<i>Aspergillus saitoi</i>)	no específica G >> A >> C > U	106	11.450	255
U1 (<i>Ustilago sphaerogena</i>)	G	105	11.235	255,257
U2 (<i>Ustilago sphaerogena</i>)	purinas	113	12.300	193,256
α -sarcina (<i>Aspergillus giganteus</i>)	A-G (G)	150	16.987	193,201

Tabla 2.8. Características de las ribonucleasa bacterianas y fúngicas

En la tabla se recogen algunas de las características de las distintas ribonucleasas bacterianas y fúngicas cuyas secuencias han sido comparadas en esta tesis. Como puede observarse, la mayoría de estas proteínas presentan una actividad específica sobre las bases nitrogenadas derivadas de la purina, guanina (G) y adenina (A), mientras que, en otros casos, digieren también las bases pirimidínicas citosina (C) y uracilo (U), y sus derivados. Para la α -sarcina ha sido descrita una actuación preferencial sobre guanina (G) (205), aunque corta en una secuencia específica del ARNr entre una adenina (A) y una guanina (G) (45) según ha sido descrito en el apartado 1.3.5.5.1. Se indica como ref. la referencia de la que han sido tomados los datos correspondientes a cada ribonucleasa.

desarrollo del tumor considerado como grado de invasión de los órganos de la cavidad peritoneal.

Para determinar dicho grado de crecimiento, se estableció la siguiente escala: 0, no se observaba crecimiento; 1, aparición de pequeños nódulos independientes de 2 a 3 mm de diámetro o detección de un único órgano peritoneal infiltrado; 2, aparición de más de un órgano infiltrado por el tumor; 3, más de un órgano con infiltración masiva, que formaba nódulos de 5 mm de diámetro.

2.12. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la α -sarcina con distintas ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico.

En dicho estudio, se procedió al alineamiento de las secuencias de aminoácidos de distintas ribonucleasas de origen microbiano con las secuencias de las aspergilinas.

La asignación de residuos y el alineamiento de las secuencias se realizó tomando como puntos de referencia los aminoácidos de la ARNasa T1 de *Aspergillus oryzae* (255) Glu-58 (E), Arg-77 (R) e His-92 (H), implicados en el centro activo de la proteína.

Como sugieren Hill y col (255), para llevar a cabo dicho alineamiento, han sido consideradas distintas homologías entre los aminoácidos, en base a características como su peso molecular, un grado de hidropaticidad equivalente o la carga de sus cadenas laterales. Estas homologías son Thr(T) = Ser(S); Tyr(Y) = Phe(F); Gly(G) = Ala(A); Val(V) = Leu(L) = Ile(I); Asp(D) = Asn(N) = Glu(R) = Gln(Q).

Las principales características de las ribonucleasas utilizadas en este estudio se recogen en la tabla 2.8.

3. Resultados y discusion

3.1. Cultivo de *Aspergillus giganteus* MDH 18894

3.1.1. Cultivo en medios sólidos y líquidos

3.1.1.1. Cultivo en medios sólidos

El *Aspergillus giganteus* fue clasificado por algunos autores como una subespecie de *A. clavatus* ya que, presentaba las cabezas de los conidióforos en forma de clavo o estaca (162). Dentro del género *Aspergillus*, el *A. giganteus* es uno de los grupos más fácilmente identificables ya que, en cultivos del hongo en medio sólido, aparecen conidióforos muy largos que empiezan a producirse en los bordes de la colonia durante la etapa de esporulación, extendiéndose más tarde a toda la superficie de la misma (162).

Otra de las características más destacables de esta especie, es el crecimiento zonado que presentan sus colonias y la alternancia de conidióforos de desarrollo temprano, con una longitud de entre 2 mm y 4 mm, y conidióforos de desarrollo posterior, más largos, que exceden incluso de 1 cm.

Los conidióforos largos son fototrópicos y su producción se ve favorecida a la temperatura de 20°C. La elongación de estos conidióforos podría estar relacionada con un aumento proporcional de la intensidad de absorción del medio, a una longitud de onda conocida, y estaría mediada, aparentemente, por un β -caroteno de color amarillo, que absorbe entre los 400 y los 500 nm, así como por otros compuestos coloreados, también de naturaleza carotenoidea, que absorben entre los 300 nm y los 380 nm (162).

Todas estas características permitieron llevar a cabo la identificación del hongo, para lo cual el *A. giganteus* MDH 18894 se creció en placas de Petri de 10 cm de diámetro, con una capa de, aproximadamente, 4 mm de Agar de Czapek-Dox, a temperatura ambiente entre 22°C y 24°C y con iluminación. De esta forma se obtuvieron los cultivos que quedan recogidos en las figuras 3.1. y 3.2., en donde se observa el aspecto que presentan las colonias del hongo a distintos tiempos de cultivo.

El crecimiento zonado de las colonias comienza a hacerse aparente hacia el 6º día de cultivo (ver figura 3.1. C). A los 10 días de cultivo la colonia alcanza un diámetro de 3.9 cm \pm 0.2 cm, mientras que a los 14 días de cultivo, es de 4.6 cm \pm 0.1 cm.

Los cultivos fueron estudiados a lupa triocular y a microscopía óptica (figuras 3.2. a 3.5.), de manera que fue posible constatar que el hongo presentaba características similares a las descritas por Raper y Fenell (162) para las distintas especies de *A. giganteus*, en las mismas condiciones de cultivo, por lo que el hongo se identificó como tal.

Según se recoge en la figura 3.5., el hongo presenta dos tipos de conidióforos distintos, que coexisten en la misma colonia, unos de desarrollo temprano, con una longitud aproximada de 4 mm, cuya vesícula tiene una longitud de 225 μ m \pm

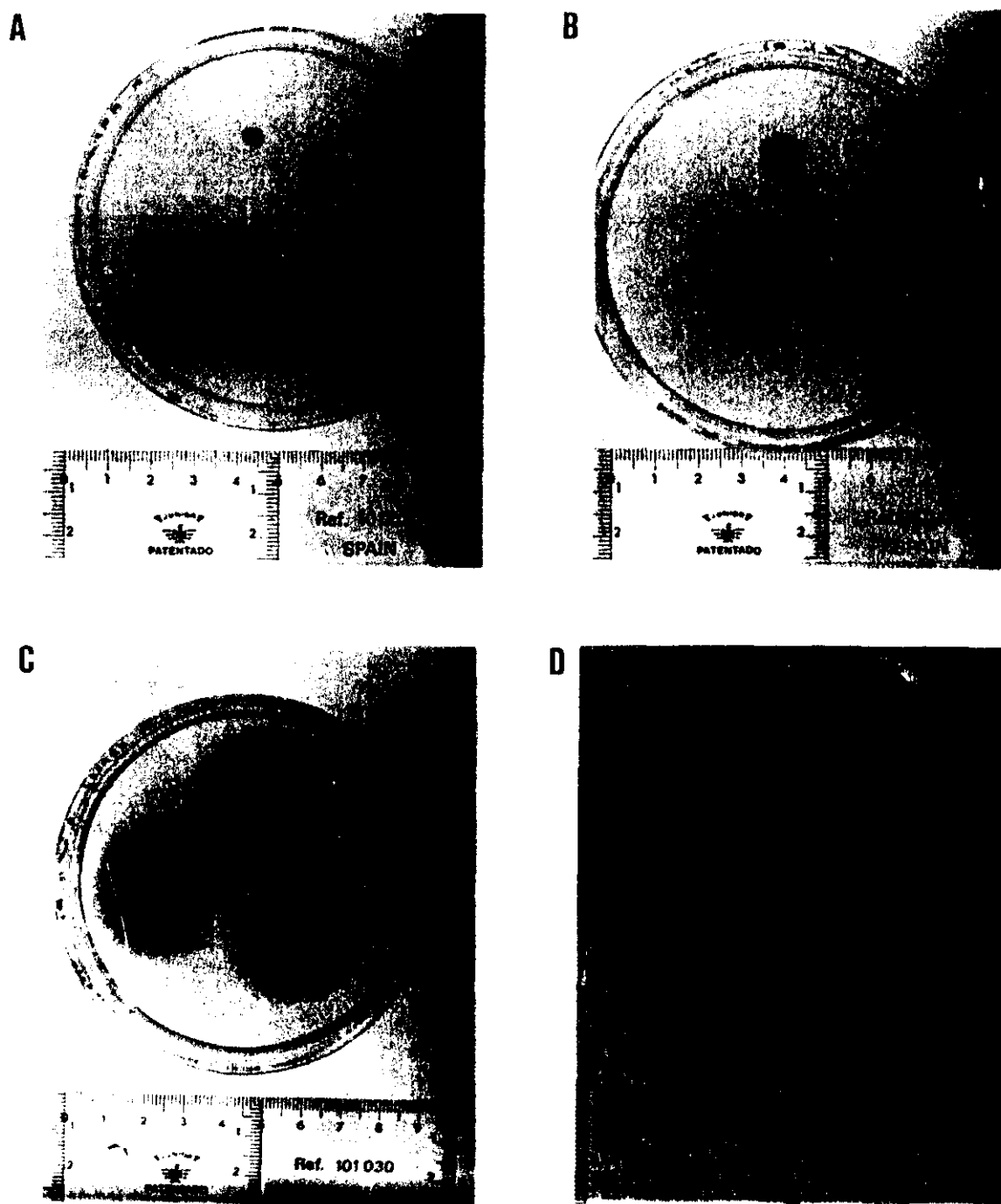


Fig. 3.1. Crecimiento de *Aspergillus giganteus* MDH 18894 en placas de agar de Czapex-Dox

En las fotografías puede observarse el aspecto que presentan las colonias de *A. giganteus* MDH 18894, sembrado en tres puntos en placas de petri con agar de Czapex-Dox. Las fotografías corresponden a los siguientes días de cultivo: A) 1º día después de la siembra, B) 3º día después de la siembra, C) 6º día y D) 16º día tras la siembra. Las placas fueron crecidas a temperatura ambiente, sin iluminación suplementaria y en atmósfera saturada de vapor de agua. En la fotografía D se observa el crecimiento zonado en un cultivo del hongo bastante avanzado; esta zonación empieza a evidenciarse a partir del sexto día de cultivo (fotografía C). El método de preparación de las placas así como el método de siembra se recogen en el apartado 2.2.1.

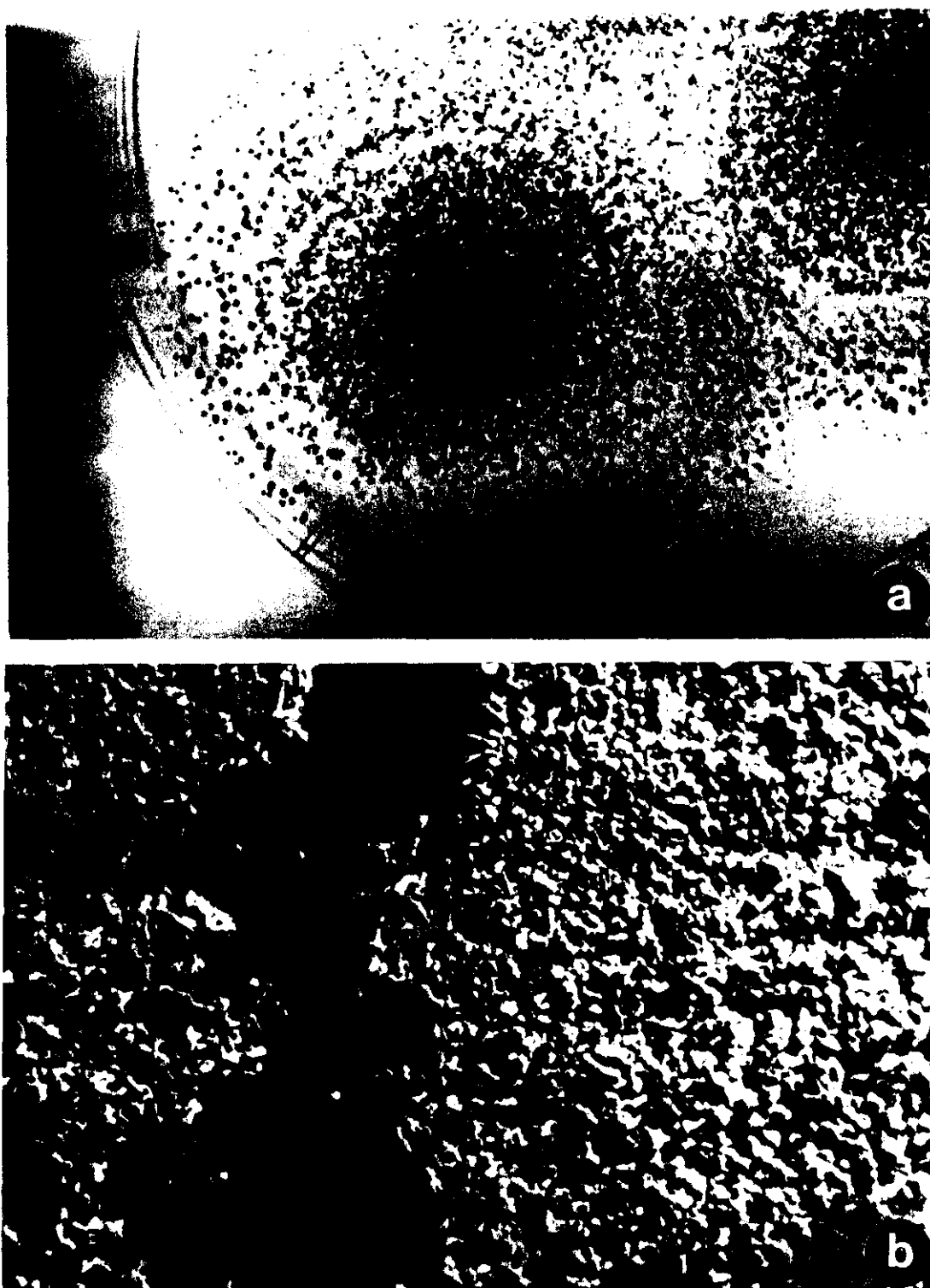


Fig. 3.2. Colonias de *Aspergillus giganteus* MDH 18894 en placas de agar de Czapek-Dox

Las fotografías recogen, en detalle, el aspecto de una de las colonias de *A. giganteus* MDH 18894, tras 13 días de cultivo en placas de agar de Czapek-Dox, sembradas en tres puntos (ver apartado 2.2.1). En la fotografía a) puede observarse como la colonia presenta crecimiento zonado y como la maduración de los conidióforos, que tiene lugar de forma centrifuga, le confieren una coloración oscura en su parte central. En la fotografía b), realizada en una lupa triocular, puede observarse como las regiones interzonales, situadas entre dos halos de crecimiento, permanecen casi completamente libre de micelio, mientras que los conidióforos confieren a la colonia un aspecto rugoso en su superficie.

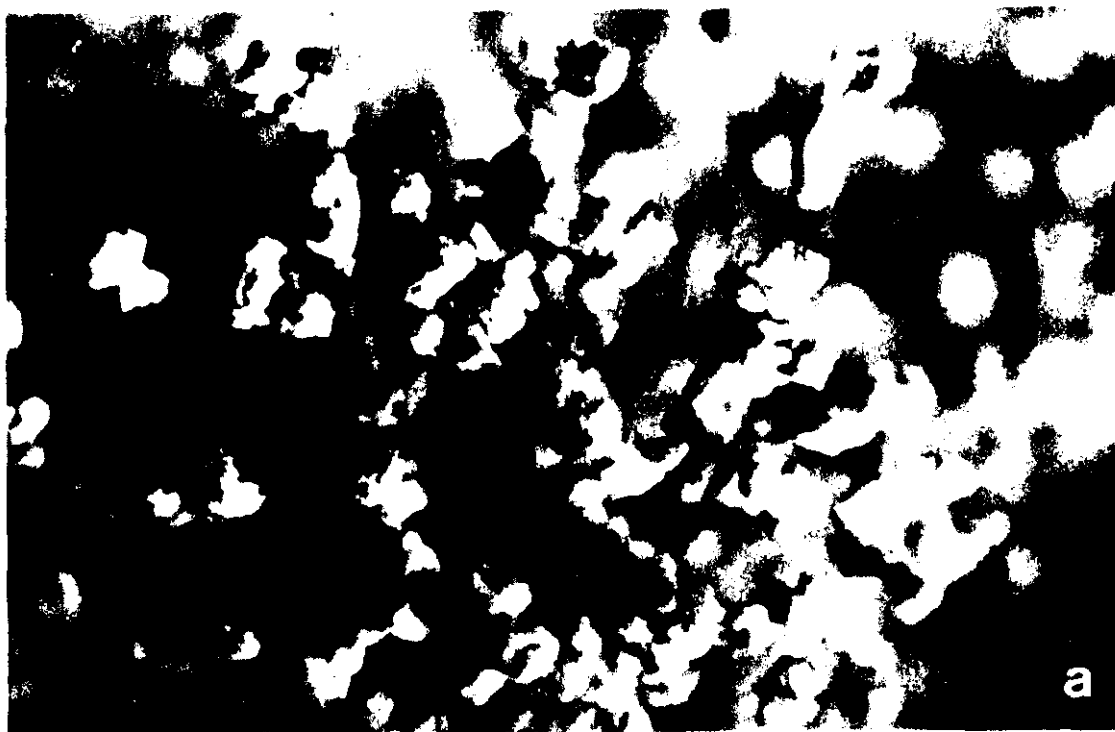


Fig. 3.3. Conidióforos de *A. giganteus* MDH 18894, observados a lupa triocular

En las fotografías se recogen, con mayor detalle, los conidióforos de *A. giganteus* MDH 18894, tal y como puede observarse en las colonias crecidas en agar de Czapek-Dox tras 13 días de cultivo. En ambas fotografías se pone de manifiesto el aspecto algodonoso de los conidióforos.

25 μm en su eje máximo, por $25 \mu\text{m} \pm 2.7 \mu\text{m}$ en su eje mínimo (fig 3.5. B), y otros de longitud superior, aproximadamente 8 mm, cuyas vesículas presentan una longitud de $350 \mu\text{m} \pm 45 \mu\text{m}$ en su eje máximo, por $34 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ en su eje mínimo (figuras 3.4. y 3.5. A). También puede observarse en estas dos figuras la presencia de una zona en la parte central de la cabeza conidial de los conidióforos gigantes, denominada collar, en la que no se desarrollan esporas. Esta zona no fértil es característica de la cepa MDH 18894.

Otros datos destacables sobre el crecimiento del hongo se obtuvieron en los cultivos realizados en tubos de agar inclinado (TAIS) con medio sólido de agar de Czapek-Dox a distintos valores de pH, según se recoge en el apartado 2.2.1. Los cultivos que presentaron mayor crecimiento al cabo de 12 días, fueron aquellos crecidos a pH 5.2, aunque estas diferencias no son significativas con respecto a los cultivos realizados a pH neutro y a pH 8.24. A este valor de pH 5.2, no fue posible apreciar la aparición de conidióforos largos, que sí se observan en los cultivos realizados a pH 8.25. Se aprecia la producción de conidióforos largos, que sí aparecen cuando el hongo es crecido a pH 8.25. Algunas características, como el color y el espesor de la colonia, también se ven alteradas con el cambio de pH.

Por tanto, condiciones como la acidificación del medio de cultivo hasta valores próximos a pH 5, o el crecimiento en oscuridad, como fue comprobado simultáneamente, no alteran significativamente el crecimiento del micelio del hongo, pero sí afectan a la formación de conidióforos largos, ya que, ni a pH 5.25 ni en oscuridad, se pueden observar en los tiempos estudiados, que fue de 25 días. Cuando el hongo se crece en medio de cultivo enriquecido con un 20% de sacarosa, aparece un micelio desorganizado y ralo al cabo de los 18 días de crecimiento.

3.1.1.2. Cultivo en medio líquido

En los cultivos realizados en medio líquido, y en ausencia de aporte externo de aire, se pudo observar cómo el micelio crece en la superficie del medio de cultivo como un césped blanquecino que se oscurece cuando empieza la esporulación.

En condiciones de aporte de aire suplementario, el cultivo se comportó de una manera completamente diferente. Entre las 24 y las 48 horas después de la siembra, el micelio ya era visible, y a los 7 días comienza a apreciarse una clara agregación del mismo, empezando a formarse una capa de micelio de consistencia sólida y apariencia gelatinosa en la superficie del cultivo.

A partir de este momento, el hongo comienza a esporular y el medio de cultivo se oscurece hasta tomar una coloración marrón. A los trece días, el período de incubación se dio por finalizado, añadiéndose al cultivo azida sódica hasta una concentración final aproximada del 0.2% p/v.

En ambos casos, el oscurecimiento del medio de cultivo se relacionó con la síntesis por parte del hongo de compuestos carotenóides, comparables a los que han sido descritos anteriormente (162).

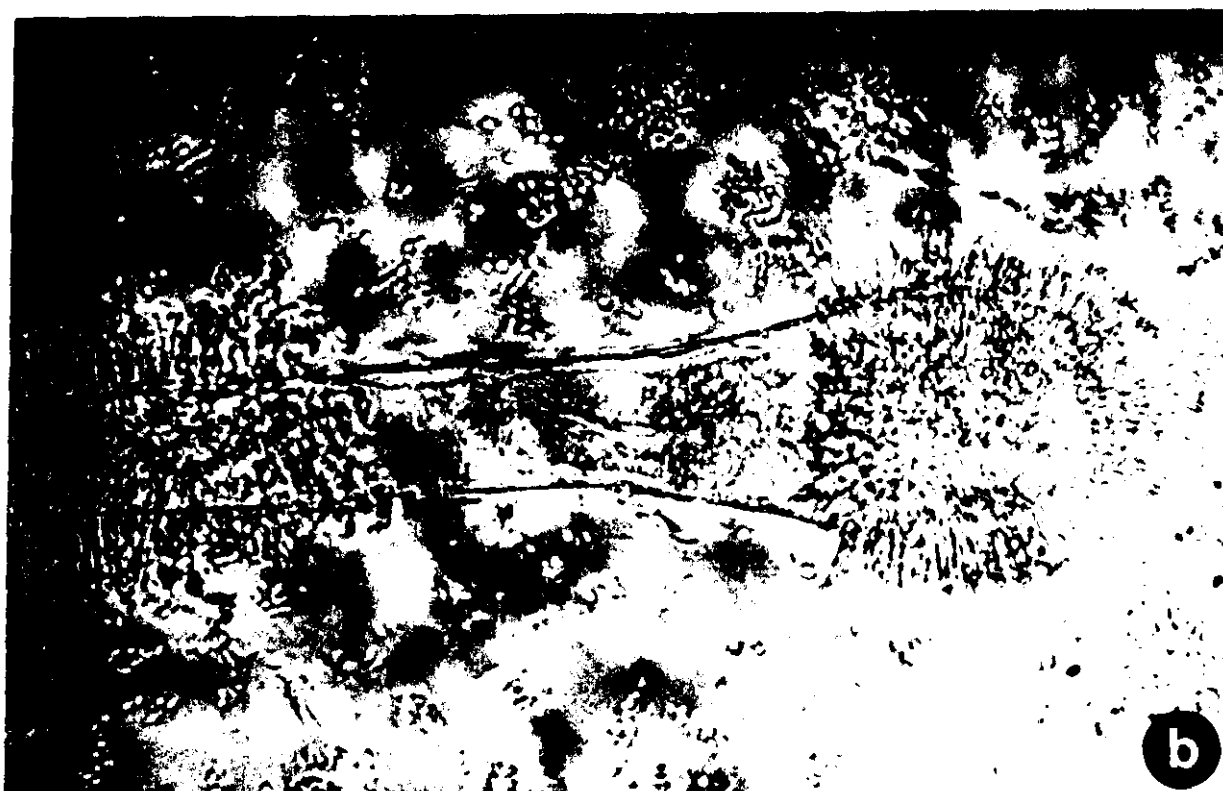
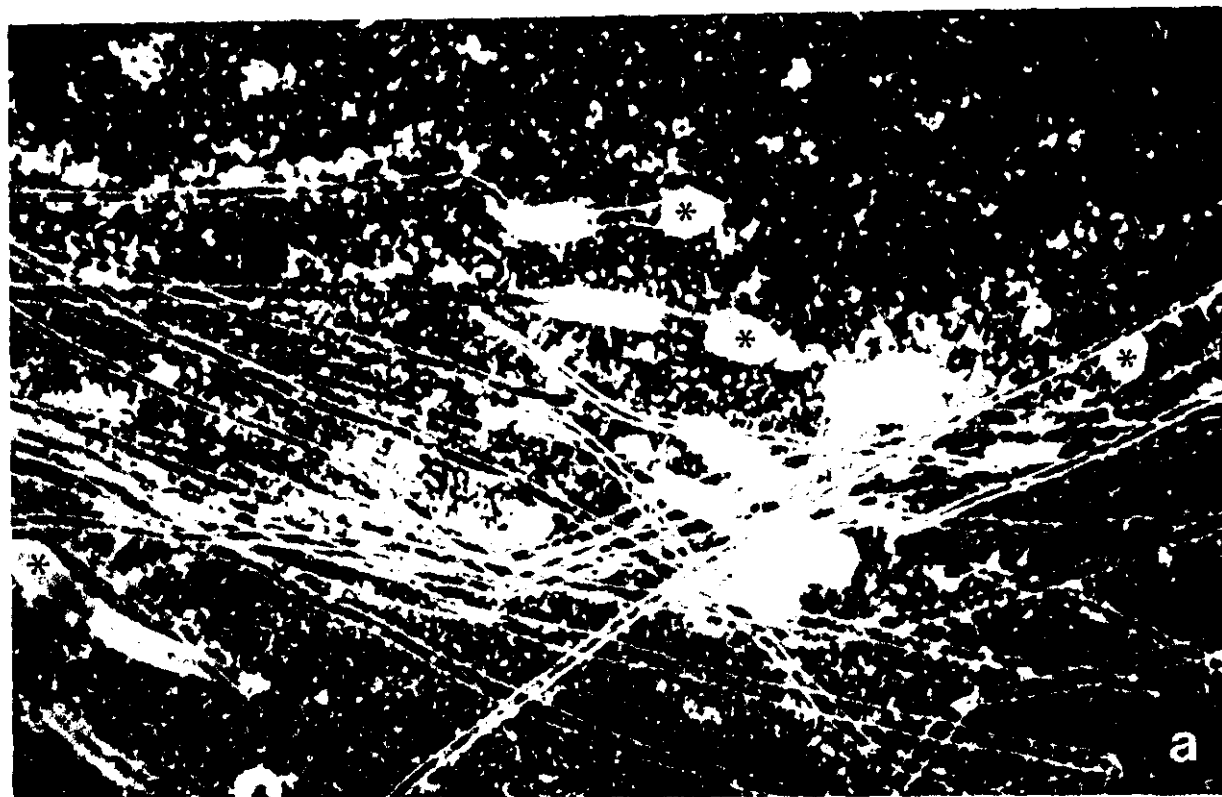


Fig. 3.4. Detalle del micelio de *A. giganteus* MDH 18894 y de su estructura conidial

a) La fotografía reproduce una preparación realizada a partir de una muestra de una colonia de *A. giganteus* MDH 18894, crecida en placas de agar de Czapek-Dox durante 13 días, y ha sido realizada en contraste de fase. En ella pueden observarse como el micelio está compuesto por hifas transparentes y no tabicadas, a partir de las cuales se desarrollan los conidioforos con las cabezas conidiales de forma clavada, características de esta cepa. Con un asterisco, han sido señaladas algunas de las cabezas conidiales que presentan una zona o 'corona' libre de esporas que aparecen, normalmente, en los conidióforos de mayor longitud del hongo, según ha sido descrito en el apartado 3.1.1.1. y que, a mayor detalle, aparecen en la fotografía b).

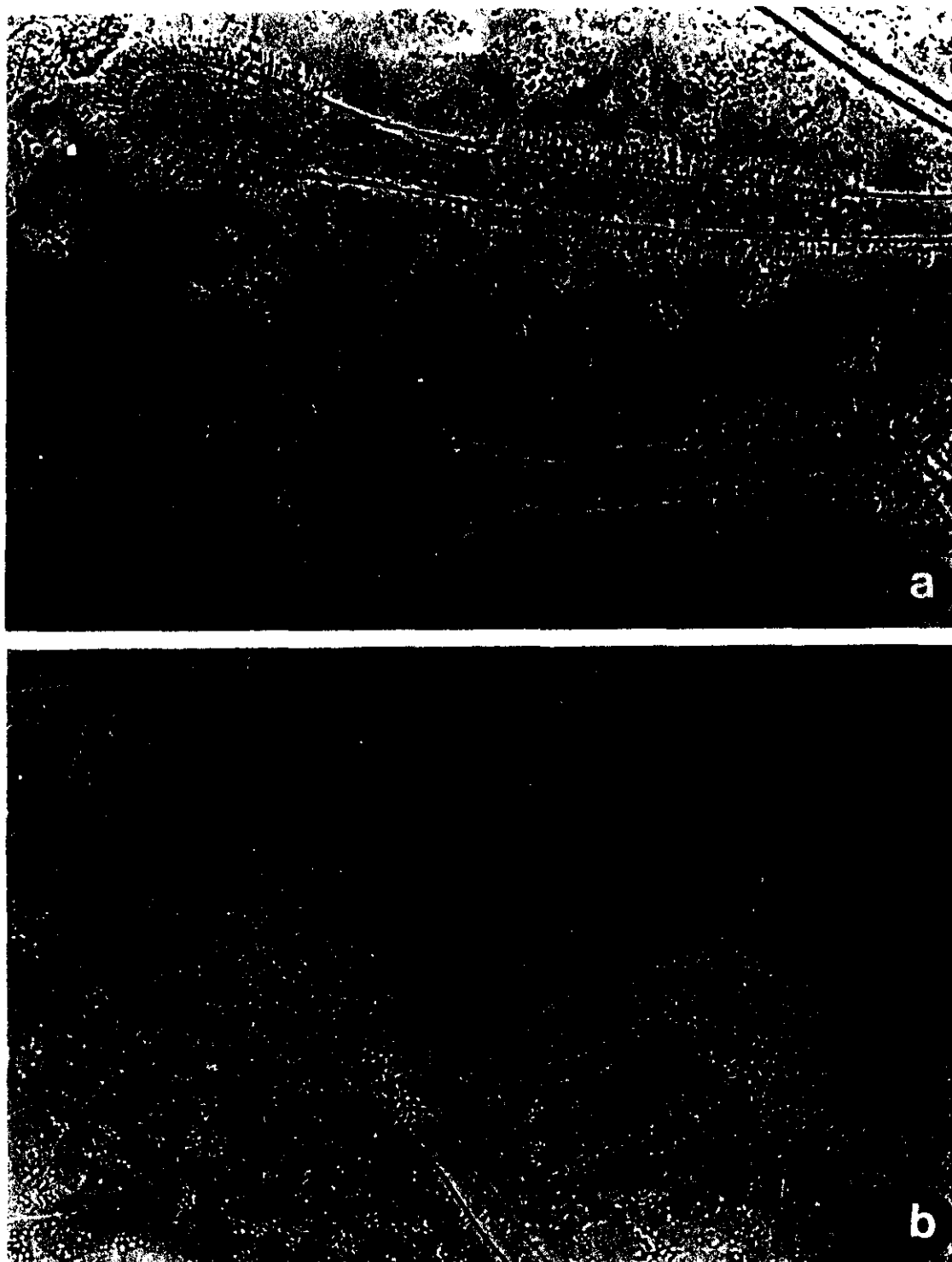


Fig. 3.5. Detalle de los conidióforos de *A. giganteus* MDH 18894

En las fotografías se recogen, con mayor detalle, los dos tipos de conidióforos de *A. giganteus* MDH 18894 que se desarrollan en una colonia crecida en agar de Czapek-Dox tras 13 días de cultivo. La fotografía a) corresponde con un detalle de las cabezas conidiales del hongo, que presentan la corona libre de esporas; este tipo de estructura es mas común entre los conidióforos mayores del hongo. En la fotografía b) se recogen los conidióforos de forma clavada, que desarrollan esterigmatas y esporas en toda la superficie de la cabeza conidial (apartado 3.1.1.1.).

3.1.2. Variación de las condiciones de cultivo

El interés por el estudio de las condiciones de cultivo del *Aspergillus giganteus* MDH 18894 surgió de la búsqueda de un procedimiento de cultivo que asegurara la producción de α -sarcina por parte del hongo, favoreciera su acúmulo en el medio de cultivo y fuera fácilmente adaptable a los métodos industriales. Así se intentó obtener un medio de cultivo económico y de fácil preparación, en el que la producción de la proteína no se viera alterada.

De esta manera, y tras la estandarización de las condiciones de cultivo del hongo en medios sólidos, siguiendo las indicaciones de los expertos en el cultivo de *Aspergillus* (162), se puso a punto el cultivo en medio líquido, en las condiciones sugeridas por Olson y col (40) y utilizando el medio de cultivo en el que estos autores obtenían la mayor cantidad de α -sarcina.

Una vez hecho esto, el siguiente planteamiento fue la modificación de la composición del medio, para lo cual se variaron las fuentes de carbono y nitrógeno originales, que fueron sustituidos por productos comerciales utilizados en alimentación, más económicos y accesibles para nosotros. Así, el almidón de maíz de Sigma, utilizado hasta entonces como fuente de carbono fue sustituido por Maizena (C.P.C. España, S.A.), harina de maíz, que era previamente hidrolizada con HCl para aumentar la concentración de monosacáridos y disacáridos en el medio (ver apartado 2.2.6.2.). Por otro lado, el extracto de carne de ADSA-MICRO, utilizado como fuente de nitrógeno, fue sustituido Bovril (Bovril Ltd., Inglaterra), un extracto de carne utilizado como complemento alimenticio.

Los distintos medios de cultivo fueron preparados, sembrados y crecidos durante 13 días, según se refiere en el apartado 2.2.6., donde también quedan recogidas las distintas condiciones de temperatura y aireación de los cultivos: temperatura ambiente, 30° C, agitación ocasional y deficiencia de O₂. Cuando el cultivo se dió por finalizado, en cada caso se determinaron los valores de pH, conductividad, concentración de hexosas, absorción a 280 nm y concentración de α -sarcina acumulada en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros en los medios de cultivo, referidos a los 13 días de cultivo, quedan recogidos en las gráficas 3.6. a 3.17., excepto los datos de absorción a 280 nm, que mantenían una variación errática difícilmente explicable.

Para una mejor comprensión de estos resultados, hay que señalar que los valores obtenidos en estas determinaciones presentaron grandes variaciones, ya que el sistema estudiado es un sistema metabólicamente activo. La variabilidad de las medidas está determinada en función de dos factores: consumo de los componentes del medio de cultivo y producción de metabolitos por el hongo.

A pesar de la dificultad que planteó su interpretación, los resultados proporcionaron un método sencillo para realizar el seguimiento de la producción de α -sarcina y permitieron la

elección de un medio de cultivo aceptable, en base a la cantidad de proteína acumulada y a la estabilidad que ésta manifestó a lo largo de todo el cultivo. El medio elegido permitió también la puesta a punto de un método de purificación rápido y con mayor rendimiento que el obtenido hasta el momento.

Los valores observados en los distintos días de cultivo para cada uno de los parámetros estudiados, quedan recogidos en las gráficas a modo de de barras que presentan distinto relleno para cada una de las condiciones de cultivo. Para cada uno de los medios de cultivo se representó en una primera figura (fig. 3.6., 3.8., 3.10., 3.12., 3.14. y 3.16.) la concentración de α -sarcina en mg/l, obtenidas por radioinmunoensayo, en función de los días y de las condiciones de cultivo.

Los demás parámetros se recogieron de la siguiente forma: 1) la concentración de azúcares se representó como incremento de hexosas en mg/ml en los distintos días de cultivo y para cada una de las condiciones estudiadas, considerando como valor de referencia la concentración inicial observada en el día 0; 2) los valores de pH y 3) los valores de fuerza iónica aparecen en valores absolutos.

El análisis de estos resultados para cada parámetro, ha sido realizado de forma global, de manera que, a continuación, se recogen los datos mas significativos.

3.1.2.1. Variaciones en el crecimiento

Las distintas condiciones de cultivo permitieron observar como el crecimiento de *Aspergillus giganteus* MDH 18894 está en función de factores como el pH y la disponibilidad de oxígeno (162), de esta manera, los cultivos presentaban aspectos distintos.

Así, los medios crecidos a temperatura ambiente y a 30°C, tras un período de crecimiento en toda la densidad del cultivo y que normalmente puede estimarse en 3 días, el micelio se organizaba en la superficie, en donde se producía la formación de los conidióforos y la esporulación. Por el contrario, en condiciones de agitación y de deficiencia de oxígeno, sólo se observó crecimiento en densidad durante todo el tiempo que se mantuvo el cultivo.

Como será analizado a continuación, parece evidente que el comportamiento metabólico del hongo y la excreción de distintos metabolitos al medio de cultivo, están relacionados con la su crecimiento, así como con la organización del micelio en superficie y con los procesos de esporulación. Este hecho coincidió, en todo momento, con un mayor consumo de hexosas y con un aumento de la cantidad de α -sarcina en los medios crecidos sin agitación y con oxigenación normal.

3.1.2.2. Variaciones de pH

El valor inicial de pH observado en los medios de cultivo, resultó dependiente de la presencia o no de peptona triptica en

Medio 1

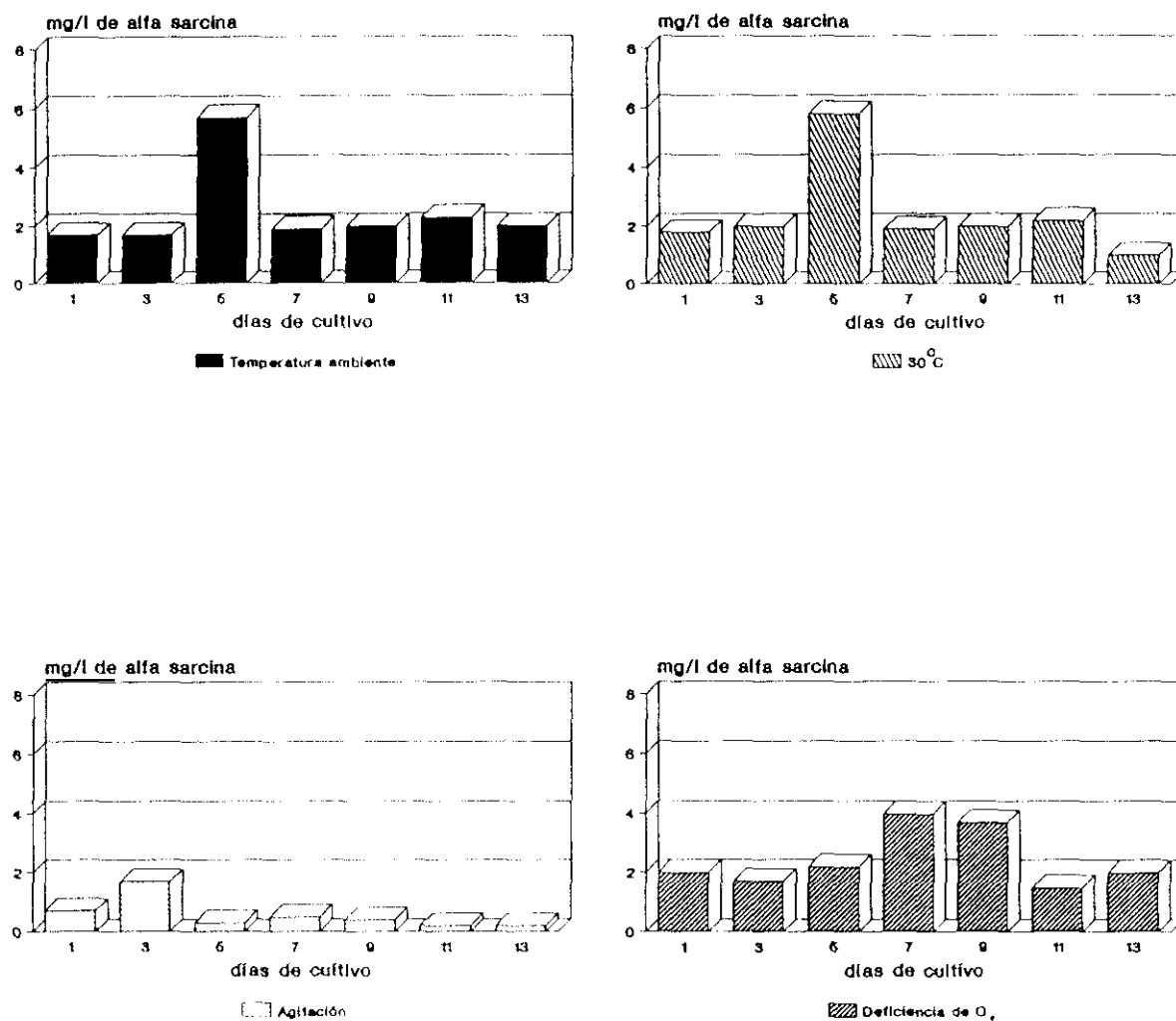
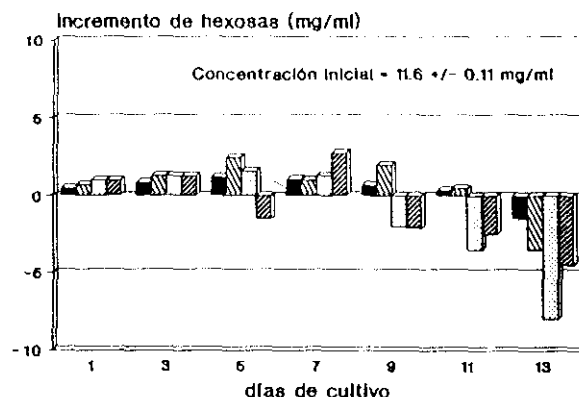


Fig. 3.6. Concentración de α -sarcosina en el medio 1 de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

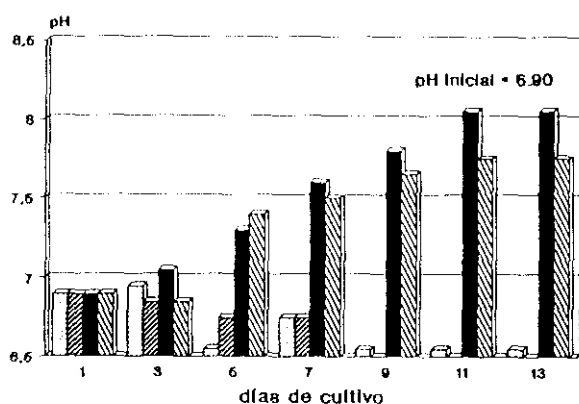
En las gráficas se representa a modo de barras, la concentración de α -sarcosina detectada por radioinmunoensayo en mg/l en los días de cultivo 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, para los cultivos realizados en el medio 1 y en las distintas condiciones de cultivo (temperatura ambiente, 30°C, agitación y deficiencia de O₂ según se describe en el apartado 2.2.6.). El método de radioinmunoensayo se describe en el apartado 2.8.2.1. y la composición del medio de cultivo 1, en la tabla 2.6.

Medio 1

Azúcares



pH



Fuerza iónica

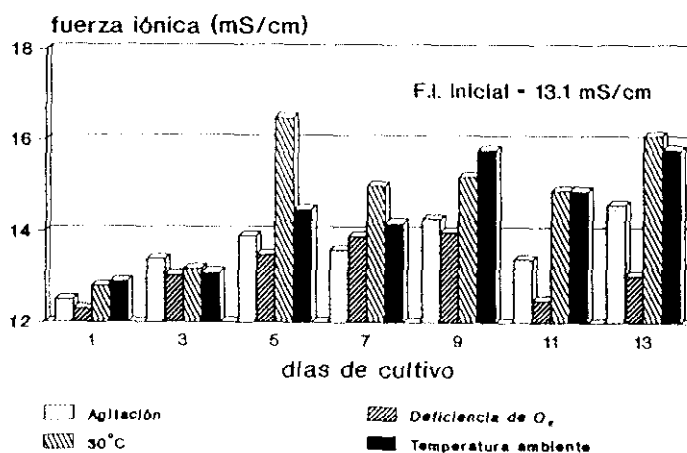


Fig. 3.7. Variación de los valores de los distintos parámetros determinados en el medio 1 para los distintos días de cultivo

En las gráficas se representan el incremento de la concentración de hexosas (azúcares), expresada en mg/ml, el valor de pH y el valor de fuerza iónica, en mS/cm, observados en los cultivos de *A. giganteus* MDH 18894 crecido en el medio 1. En todos los casos se representan a modo de barras los valores obtenidos para cada parámetro en los días de cultivo y condición de cultivo indicados. En cada gráfica se incluye el valor inicial observado en el medio de cultivo en el momento de la siembra. La concentración de hexosas ha sido determinada por el método de Dubois y col (426) según se describe en el apartado 2.3.6. de materiales y métodos y la composición del medio 1, en la tabla 2.6.

Medio 2

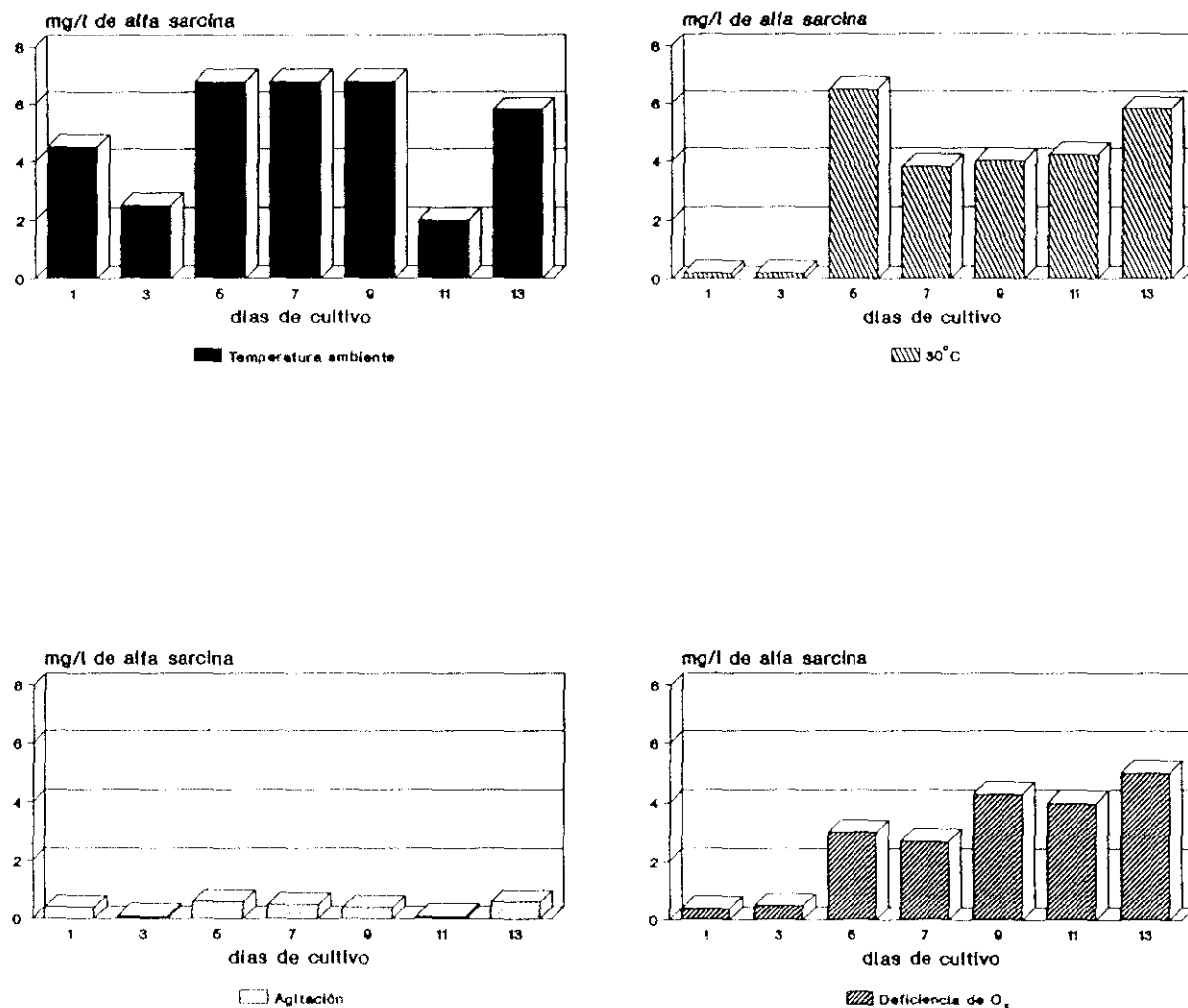
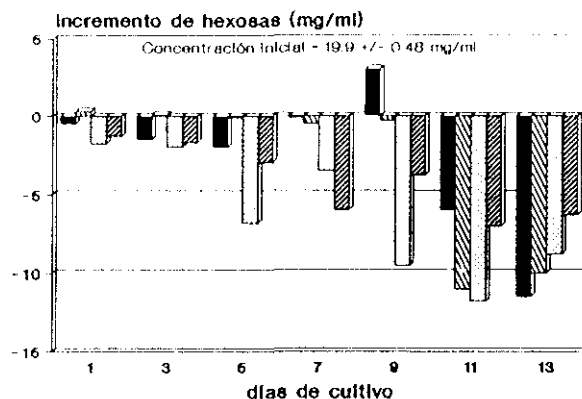


Fig.3.8. Concentración de α -sarcina en el medio 2 de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

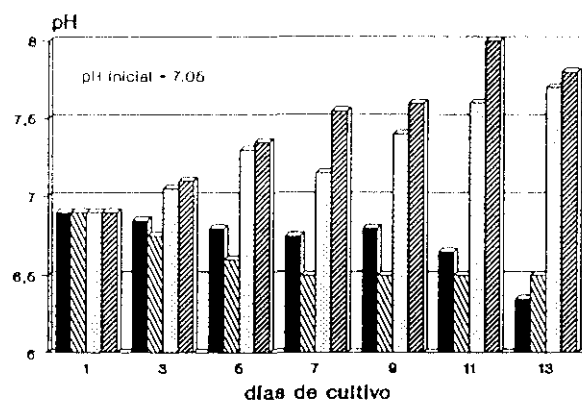
En las gráficas se representa a modo de barras, la concentración de α -sarcina detectada por radioinmunesayo en mg/l en los días de cultivo 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, para los cultivos realizados en el medio 2 y en las distintas condiciones de cultivo. El método de radioinmunoensayo se describe en el apartado 2.8.2.1. y la composición del medio de cultivo 2, en la tabla 2.6.

Medio 2

Azúcares



pH



Fuerza iónica

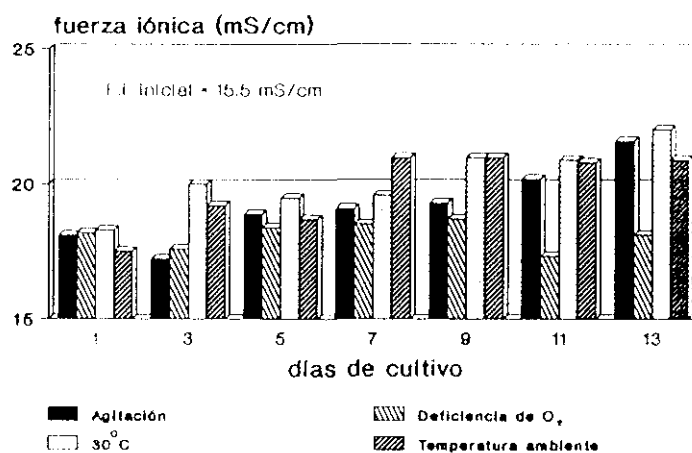


Fig.3.9. Variación de los valores de los distintos parámetros determinados en el medio 2 en los distintos días de cultivo

En las gráficas se representan el incremento de la concentración de hexosas (azúcares), expresada en mg/ml, el valor de pH y el valor de fuerza iónica, en mS/cm, observados en los cultivos de *A. giganteus* MDH 18894 crecido en el medio 2. En todos los casos se representan a modo de barras los valores obtenidos para cada parámetro en los días de cultivo y condición de cultivo indicados. En cada gráfica se incluye el valor inicial determinado en el medio de cultivo en el momento de la siembra. La concentración de hexosas ha sido determinada por el método de Dubois y col (425) según se describe en el apartado 2.3.6. de materiales y métodos y la composición del medio 2, en la tabla 2.6.

Medio 3

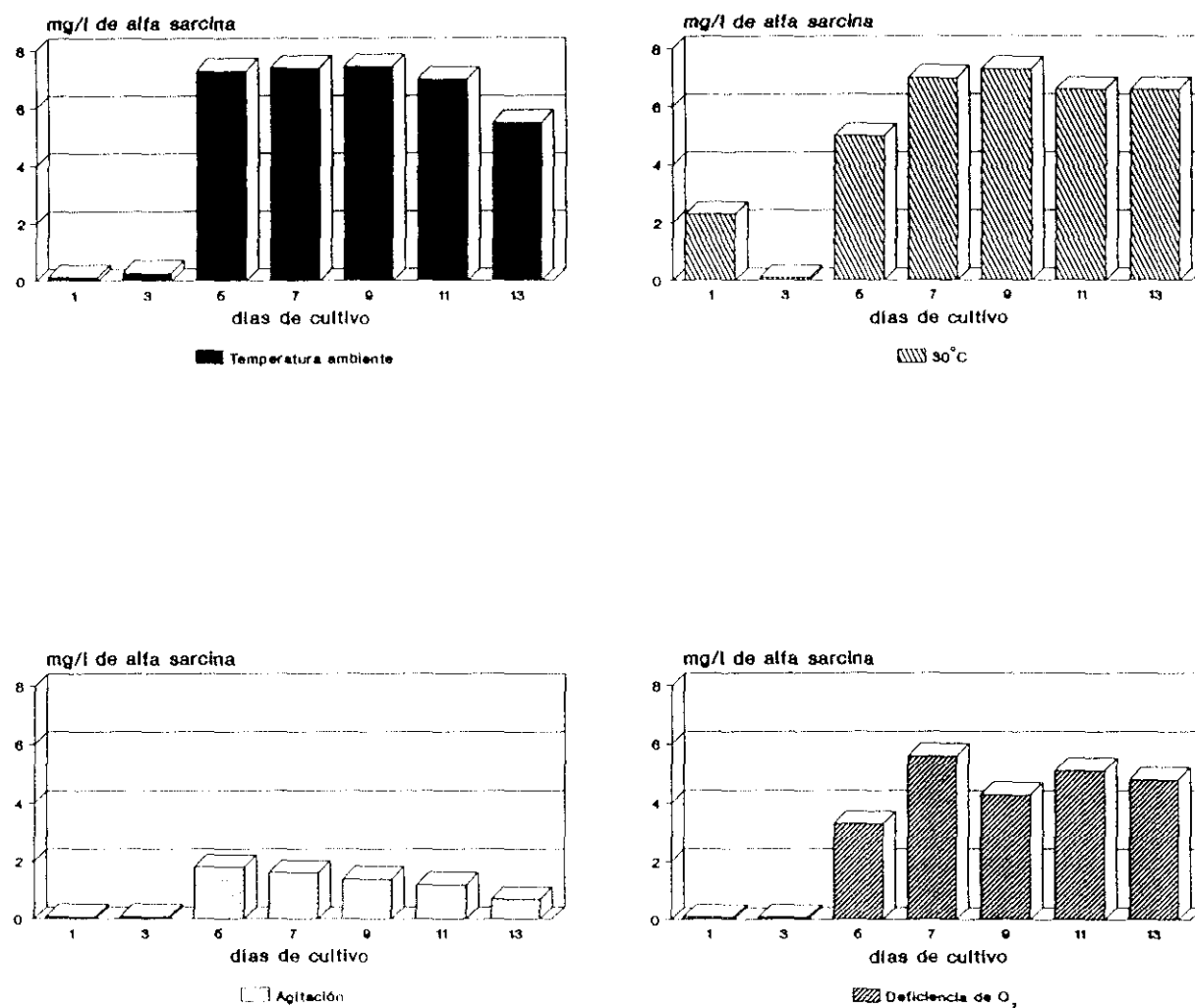
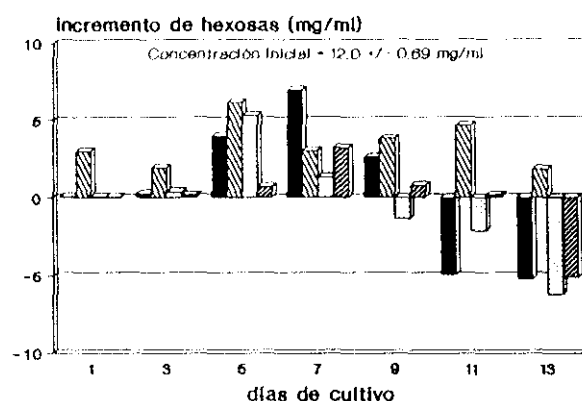


Fig.3.10. Concentración de α -sarcina en el medio 3 de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

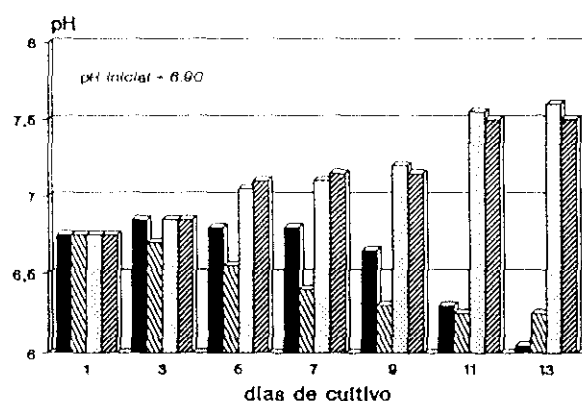
En las gráficas se representa a modo de barras, la concentración de α -sarcina detectada por radioinmunesayo en mg/l en los días de cultivo 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, para los cultivos realizados en el medio 3 y en las distintas condiciones de cultivo. El método de radioinmunoensayo se describe en el apartado 2.8.2.1. y la composición del medio de cultivo 3, en la tabla 2.6.

Medio 3

Azúcares



pH



Fuerza iónica

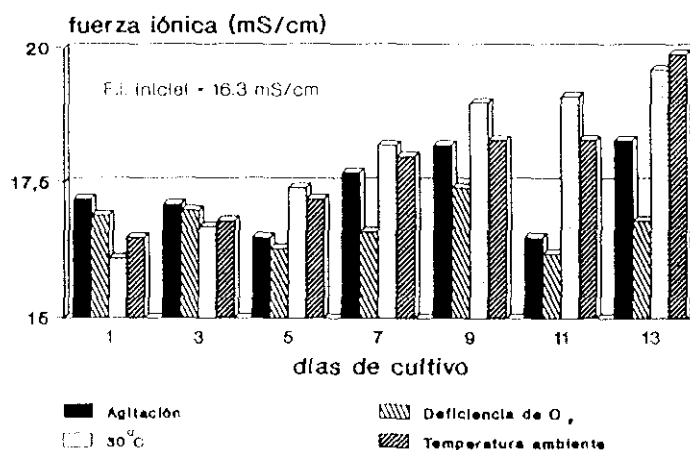


Fig.3.11. Variación de los valores de los distintos parámetros determinados en el medio 3 en los distintos días de cultivo

En las gráficas se representan el incremento de la concentración de hexosas (azúcares), expresada en mg/ml, el valor de pH y el valor de fuerza iónica, en mS/cm, observados en los cultivos de *A. giganteus* MDH 18894 crecido en el medio 3. En todos los casos se representan a modo de barras los valores obtenidos para cada parámetro en los días de cultivo y condición de cultivo indicados. En cada gráfica se incluye el valor inicial determinado en el medio de cultivo en el momento de la siembra. La concentración de hexosas ha sido determinada por el método de Dubois y col (426) según se describe en el apartado 2.3.6. de materiales y métodos y la composición del medio 3, en la tabla 2.6.

su composición. Los medios que contenían peptona (medios 1 a 3, y 6) presentaron valores de pH próximos a 7, mientras que aquellos que no la llevaban eran ligeramente básicos, con valores de pH 8.1 ± 0.07 en el medio 4 y $pH 7.8 \pm 0.1$ en el medio 5. Esta diferencia de pH puede ser explicada en base a la capacidad de tamponamiento que presentan los aminoácidos que componen la peptona triptica (451).

La variación de los valores de pH durante el cultivo, queda recogida en las gráficas 3.7., 3.9., 3.11., 3.13., 3.15. y 3.17. para cada uno de los medios. La peptona triptica parece influir también en la evolución de dichos valores.

En los medios 1 a 3 y 6, que incluyen la peptona en su composición, se observó que los cultivos crecidos a 30°C y a temperatura ambiente presentaban una tendencia hacia valores de pH ligeramente básicos, próximos a $pH = 8$, mientras que en condiciones de deficiencia de O_2 y la agitación, cuando la maizena era la fuente de carbono, se favorecía la acidificación del medio, mientras que cuando los medios contienen almidón de maíz, el pH se mantiene neutro (ver figuras 3.7., 3.9., 3.11. y 3.13., apartados 2 de pH).

En los medios de cultivo 4 y 5, que no llevan peptona, los valores de pH presentaron una evolución distinta. Partiendo de un pH 8.10, en el medio 4 por ejemplo, todos los cultivos tendieron hacia pH neutro, quedando sólo por debajo de pH 7 el cultivo de 13 días crecido en condiciones de deficiencia de O_2 . Estos medios, fueron los que presentaron un patrón más homogéneo en los parámetros determinados y en las condiciones estudiadas.

En todos los casos, las variaciones de pH no comenzaron a observarse hasta después de las 64 primeras horas de cultivo, tiempo necesario para que el crecimiento del hongo se hiciera evidente.

3.1.2.3. Variaciones en la conductividad

Los valores de conductividad iniciales obtenidos en los medios de cultivo están en función de dos condiciones: 1) la concentración inicial de 0.5% p/v de ClNa añadida, que hace que los valores de conductividad se acerquen a los que presentan las soluciones fisiológicas conocidas, entre 13.7 mS/cm y 15.5 mS/cm; y 2) la concentración inicial de almidón de maíz, ya que, se aprecian diferencias iniciales de hasta dos unidades de conductividad entre los medios que contienen un 1% p/v y los que contienen un 2% p/v de almidón.

Aún cuando la presencia de peptona triptica de caseína no parece influir en los valores iniciales de fuerza iónica, son los medios que la incluyen en su composición los que han presentado variaciones mayores en la conductividad a lo largo del cultivo, mientras que en los medios 4 y 5, el incremento de fuerza iónica no superó en ningún caso el valor de 2 mS/cm.

Medio 4

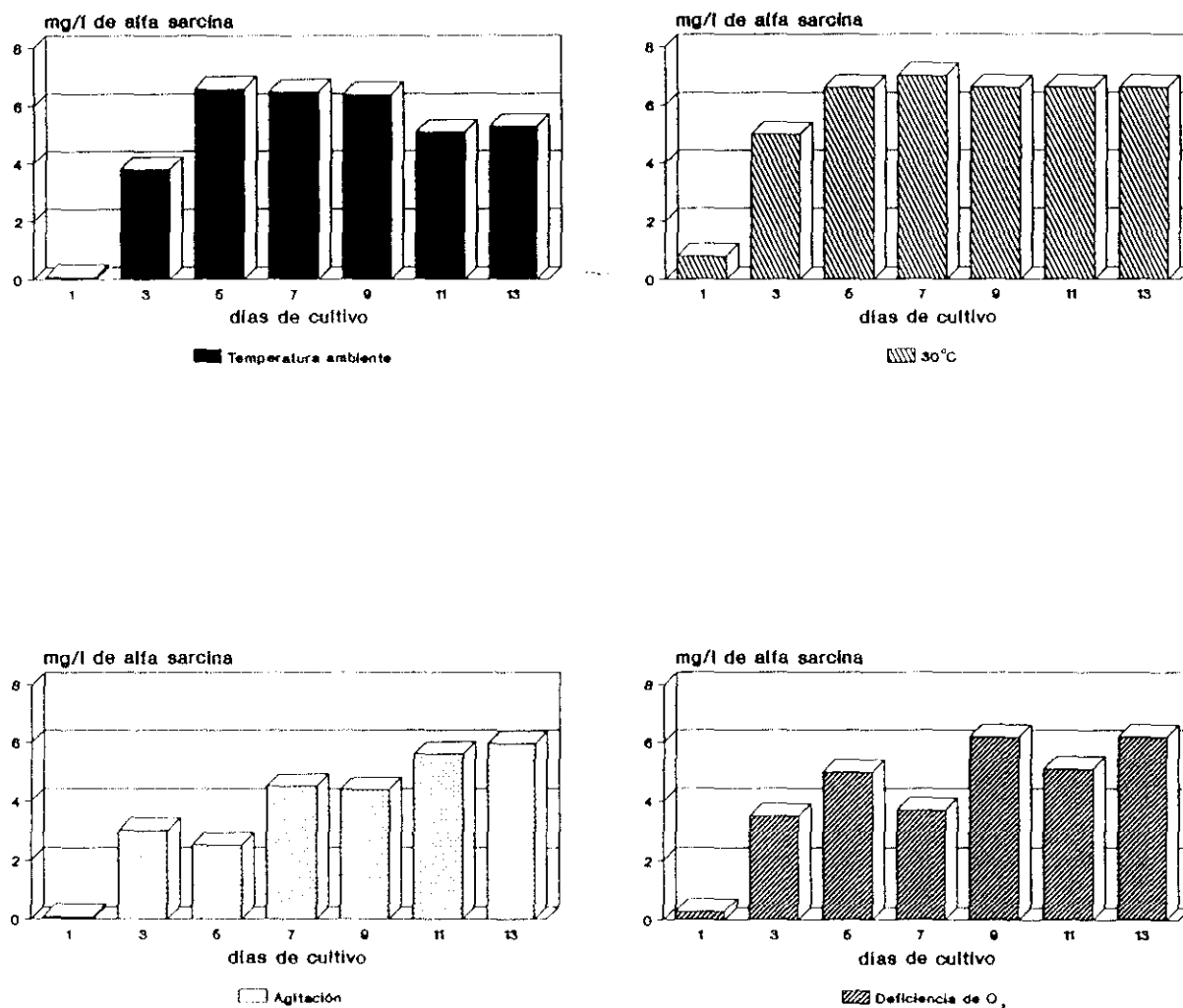
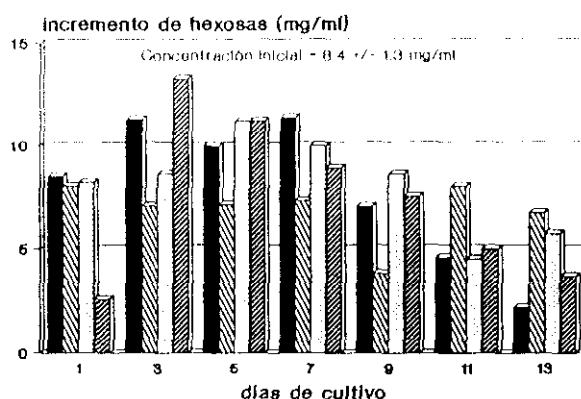


Fig.3.12. Concentración de α -sarcina en el medio 4 de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

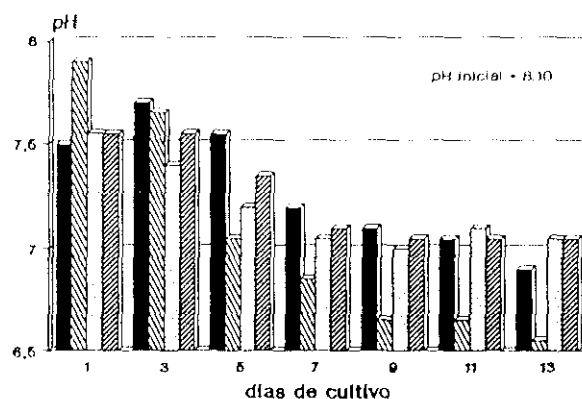
En las gráficas se representa a modo de barras, la concentración de α -sarcina detectada por radioinmunesayo en mg/l en los días de cultivo 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, para los cultivos realizados en el medio 4 y en las distintas condiciones de cultivo. El método de radioinmunoensayo se describe en el apartado 2.8.2.1. y la composición del medio de cultivo 4, en la tabla 2.6.

Medio 4

Azúcares



pH



Fuerza iónica

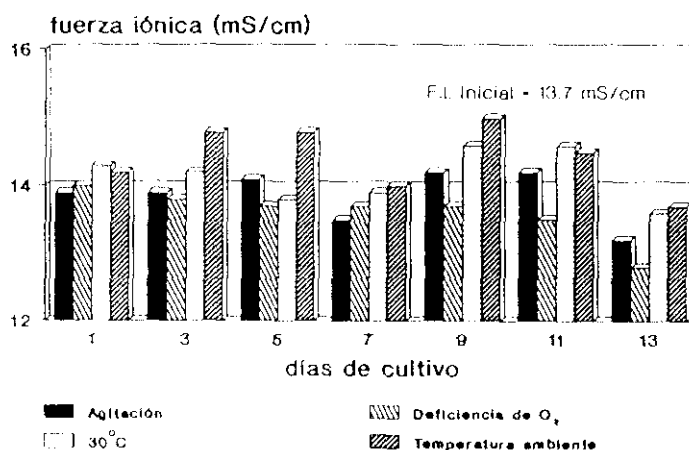


Fig.3.13. Variación de los valores de los distintos parámetros determinados en el medio 4 en los distintos días de cultivo

En las gráficas se representan el incremento de la concentración de hexosas (azúcares), expresada en mg/ml, el valor de pH y el valor de fuerza iónica, en mS/cm, observados en los cultivos de *A. giganteus* MDH 18894 crecido en el medio 4. En todos los casos se representan a modo de barras los valores obtenidos para cada parámetro en los días de cultivo y condición de cultivo indicados. En cada gráfica se incluye el valor inicial determinado en el medio de cultivo en el momento de la siembra. La concentración de hexosas ha sido determinada por el método de Dubois y col (426) según se describe en el apartado 2.3.6. de materiales y métodos y la composición del medio 4, en la tabla 2.6.

Medio 5

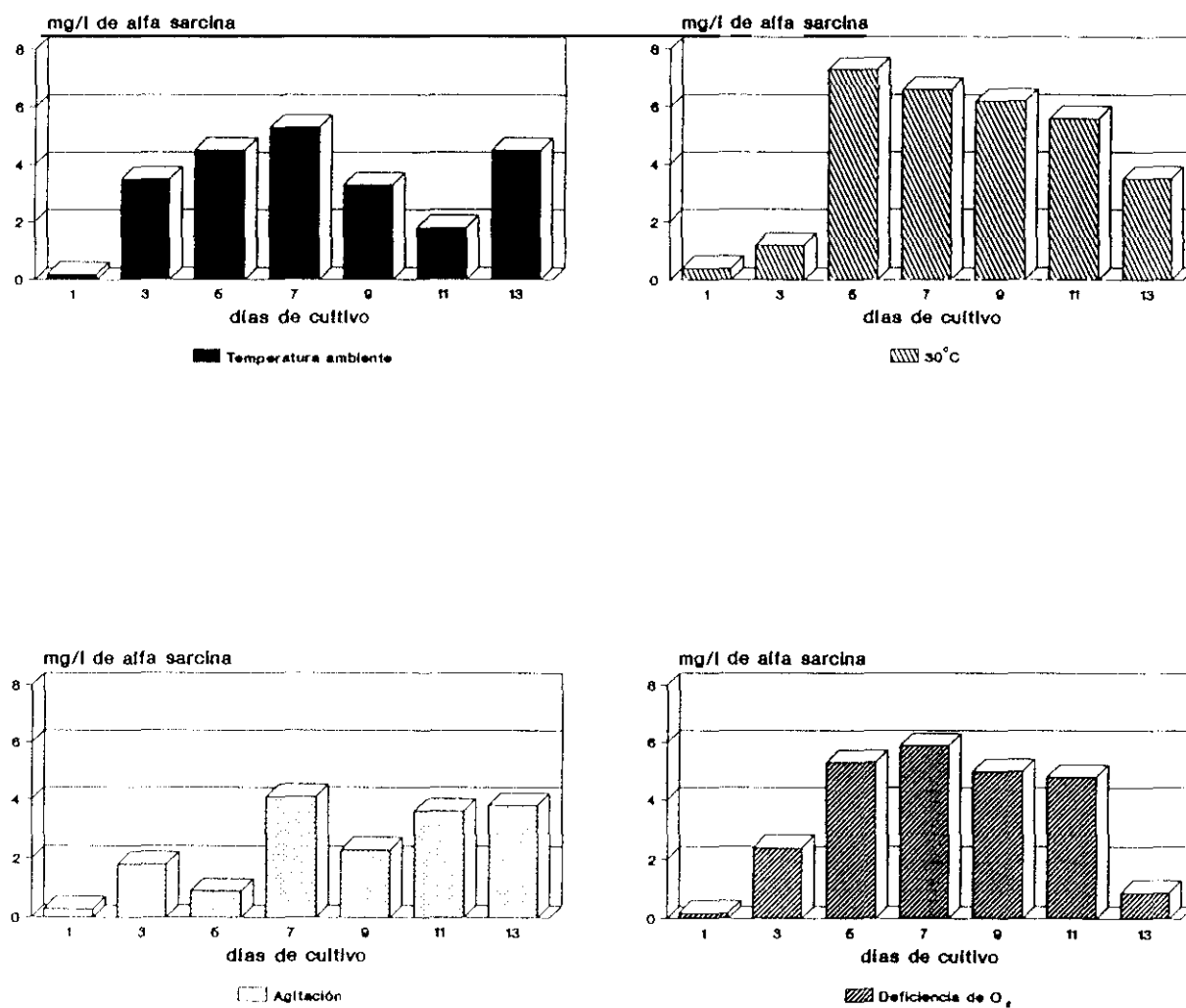
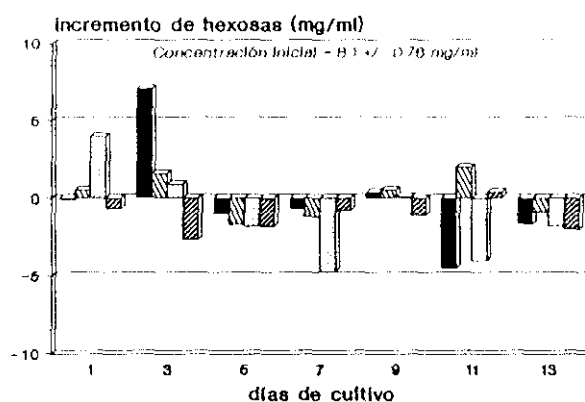


Fig.3.14. Concentración de α -sarcina en el medio 5 de cultivo de *A. giganteus* MOH 18894

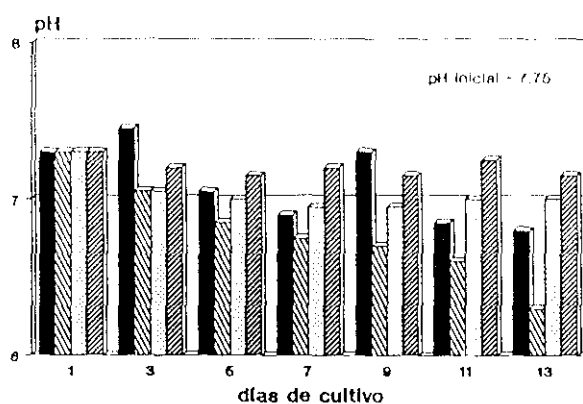
En las gráficas se representa a modo de barras, la concentración de α -sarcina detectada por radioinmunesayo en mg/l en los días de cultivo 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, para los cultivos realizados en el medio 5 y en las distintas condiciones de cultivo. El método de radioinmunoensayo se describe en el apartado 2.8.2.1. y la composición del medio de cultivo 5, en la tabla 2.6.

Medio 5

Azúcares



pH



Fuerza iónica

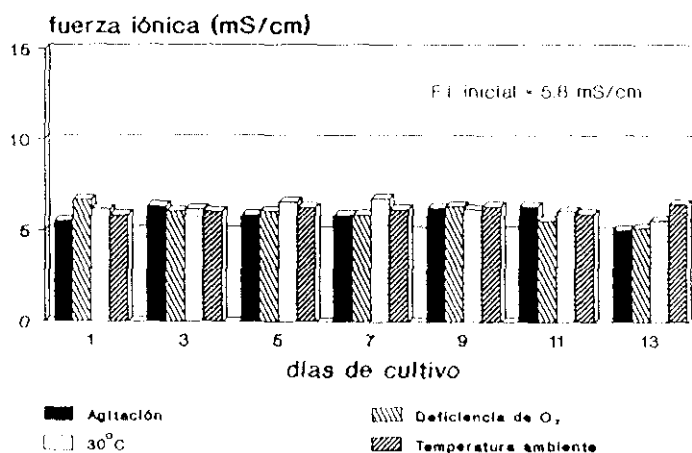


Fig.3.15. Variación de los valores de los distintos parámetros determinados en el medio 5 en los distintos días de cultivo

En las gráficas se representan el incremento de la concentración de hexosas (azúcares), expresada en mg/ml, el valor de pH y el valor de fuerza iónica, en mS/cm, observados en los cultivos de *A. giganteus* MDH 18894 crecido en el medio 5. En todos los casos se representan a modo de barras los valores obtenidos para cada parámetro en los días de cultivo y condición de cultivo indicados. En cada gráfica se incluye el valor inicial determinado en el medio de cultivo en el momento de la siembra. La concentración de hexosas ha sido determinada por el método de Dubois y col (426) según se describe en el apartado 2.3.6. de materiales y métodos y la composición del medio 5, en la tabla 2.6.

Medio 6

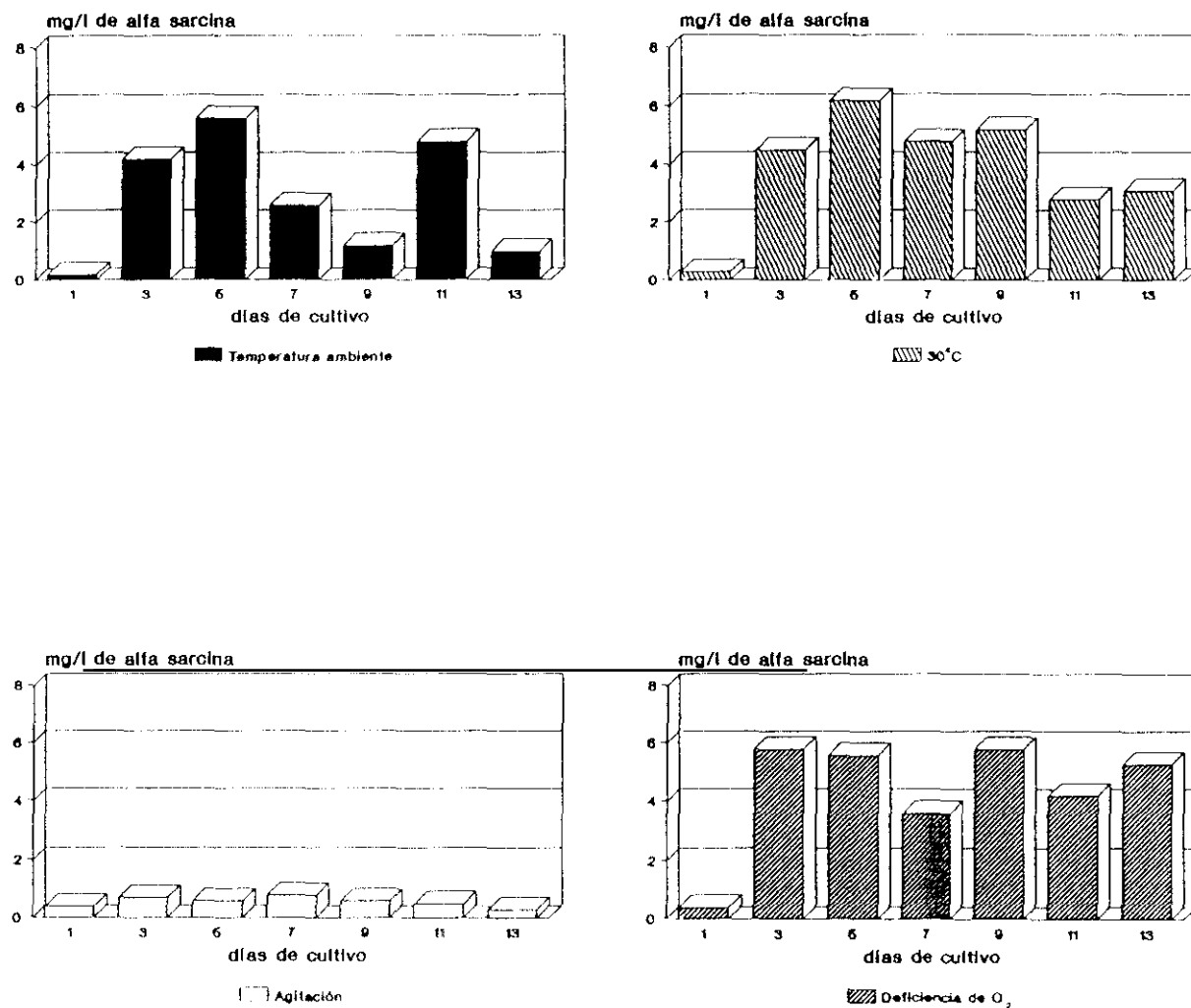
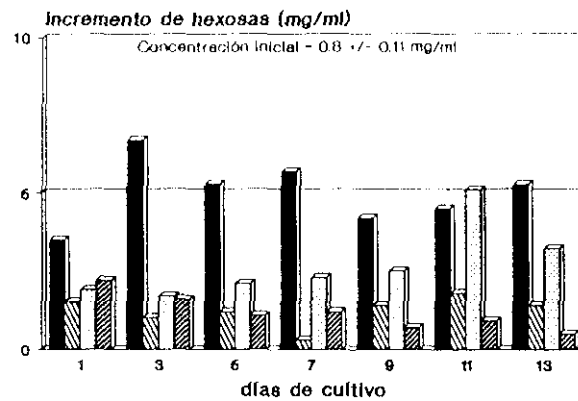


Fig.3.16. Concentración de α -sarcina en el medio 6 de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894

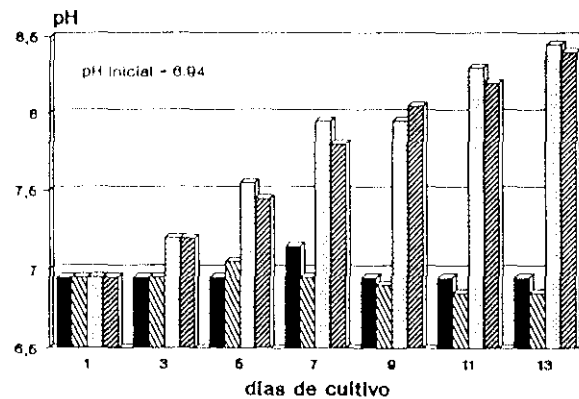
En las gráficas se representa a modo de barras, la concentración de α -sarcina detectada por radioinmunesayo en mg/l en los días de cultivo 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, para los cultivos realizados en el medio 6 y en las distintas condiciones de cultivo. El método de radioinmunesayo se describe en el apartado 2.8.2.1. y la composición del medio de cultivo 6, en la tabla 2.6.

Medio 6

Azúcares



pH



Fuerza iónica

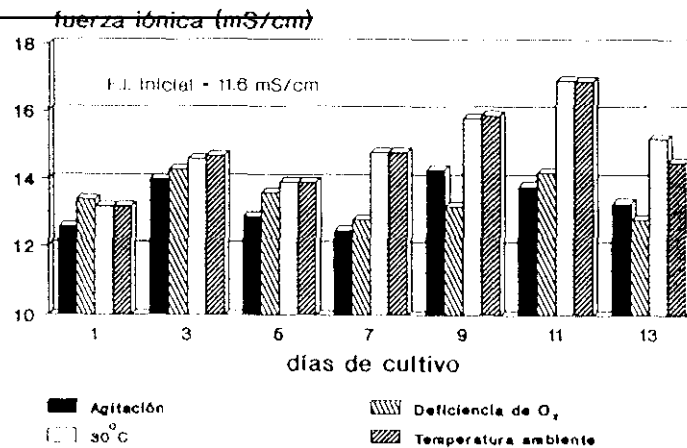


Fig.3.17. Variación de los valores de los distintos parámetros determinados en el medio 6 en los distintos días de cultivo

En las gráficas se representan el incremento de la concentración de hexosas (azúcares), expresada en mg/ml, el valor de pH y el valor de fuerza iónica, en mS/cm, observados en los cultivos de *A. giganteus* MDH 18894 crecido en el medio 6. En todos los casos se representan a modo de barras los valores obtenidos para cada parámetro en los días de cultivo y condición de cultivo indicados. En cada gráfica se incluye el valor inicial determinado en el medio de cultivo en el momento de la siembra. La concentración de hexosas ha sido determinada por el método de Dubois y col (426) según se describe en el apartado 2.3.6. de materiales y métodos y la composición del medio 6, en la tabla 2.6.

3.1.2.4. Concentración de hexosas

El método de Dubois y col (426) utilizado para la determinación de hexosas, permite valorar el contenido de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos, así como azúcares unidos a proteínas presentes en una solución, por reducción de estas moléculas en presencia de ácidos, dando origen a compuestos de color marrón-anaranjado que absorben a 490 nm (426).

La variación de los valores de hexosas observados a lo largo del cultivo estuvo, en todo momento, en relación con el crecimiento del hongo. Esta valoración de la concentración de hexosas permitió estimar la utilización de los azúcares como fuente de carbono por parte del hongo.

La tendencia general observada en la mayoría de los medios, fue de un aumento en la concentración de hexosas tras las primeras 48 horas de cultivo. Este aumento puede deberse a que la utilización de los azúcares disueltos en el medio induce al hongo a la síntesis de enzimas, excretadas al medio de cultivo, que degradan los polímeros de almidón y que son capaces de metabolizar parte de la maizena o del almidón de maíz no disuelto, lo que permite un mayor aprovechamiento de los azúcares complejos. La producción de enzimas con actividad amilasa o α -amilasa, ha sido descrita en distintas especies de varios grupos de *Aspergillus*, tales como los de *A. flavus*, *A. niger* o *A. candidus*; sin embargo, según describen Raper y Fenell (162), los miembros del grupo *A. clavatus*, en el que se incluyen las especies de *A. giganteus*, no son particularmente activos desde un punto de vista enzimático.

Este hecho no se observó en el medio 2, en donde el valor inicial de hexosas fue el más alto, y disminuyó a lo largo de todo el cultivo.

En los medios con una concentración de un 2% p/v de almidón de maíz (medios 2 a 5), los valores máximos de concentración de azúcares se obtuvieron entre el 5° y el 7° día de cultivo. En el medio 4 se produjo la mayor movilización relativa de hidratos de carbono, con un aumento de hasta 12 mg/ml en la concentración de azúcares; en dicho medio, los incrementos fueron significativos desde el primer día de cultivo, en todas las condiciones de cultivo, así como también se observó un descenso progresivo a partir del 5° ó del 7° día.

Aunque el descenso de la concentración de azúcares fue general en todos los medios en los últimos días de cultivo, en ningún caso llegó a agotarse la fuente de carbono durante el tiempo de cultivo.

3.1.2.5. Concentración de α -sarcina en los medios de cultivo

La cantidad de α -sarcina presente en los medios de cultivo fue cuantificada por radioinmunoensayo (ver apartado 2.8.2.1.), en el que se estudió la inhibición de la fijación de α -sarcina marcada con ^{125}I a pocillos con IgG específica anti- α -sarcina, por medio de las muestras de los distintos medios de cultivo. Los resultados obtenidos se recogen en las figuras 3.6., 3.8.,

3.10., 3.12., 3.14. y 3.16. para cada una de las condiciones de cultivo.

En todos los medios y condiciones de cultivo se detectó la presencia de α -sarcina tras las 24 primeras horas, obteniéndose las concentraciones mayores de proteína entre el 7° y el 9° día. El máximo valor observado fue de 7.8 mg/l y correspondió con el 7° día de cultivo del medio 3, a temperatura ambiente.

Estas cantidades coincidieron con el crecimiento del hongo en la superficie del tubo, la pigmentación oscura del micelio y el comienzo de la esporulación. Los valores se mantuvieron hasta la emisión de los conidióforos largos que caracterizan a la especie.

Se pudo observar, aunque no de forma tan drástica como apuntan Olson y col (40) y Miller y Bodley (192), que la producción de α -sarcina está en función de la composición de los medios de cultivo y de los requerimientos nutricionales del hongo. Así, la utilización de Maizena como fuente de carbono favorece tanto la obtención de concentraciones significativamente mayores de α -sarcina como que estas cantidades de proteína no sufran fluctuaciones a lo largo del cultivo. Una vez alcanzadas las concentraciones máximas de proteína en los medios con Maizena, los niveles se mantenían hasta el final del cultivo o descendían ligeramente (ver figuras 3.12. y 3.14.).

La fluctuación de los niveles de proteína observados en algunos medios de cultivo, puede ser explicado por varias razones: 1) algunos de los componentes del medio de cultivo podrían inducir la utilización de la proteína acumulada en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno, 2) las variaciones de fuerza iónica, observadas a lo largo del cultivo, podrían dar lugar a fenómenos de agregación o de precipitación, ó 3) el hongo puede sintetizar, entre otros metabolitos, enzimas proteolíticos que hidrolizan la proteína (162).

En la figura 3.18., se recogen los valores promedio de α -sarcina observados según las distintas condiciones de cultivos. La figura 3.18 A, auna los resultados obtenidos en los medios en cuya composición se incluye peptona tríptica de caseína (medios 1,2,3 y 6), mientras que la figura 3.18. B, recoge los resultados de aquellos medios en los que la peptona ha sido suprimida de su composición (medios 4 y 5). Como puede observarse, la presencia de peptona tríptica resultó crítica en algunas de las condiciones estudiadas.

Así, como dato más significativo, puede destacarse que en condiciones de agitación, mientras que las concentraciones de proteína no sobrepasaron en ningún caso los 2 mg/l en los medios con peptona, con valores medios de 0.7 mg/l, aquellos que no la llevan presentaron un valor de $4.9 \text{ mg/l} \pm 1.1 \text{ mg/l}$.

3.1.2.6. Elección del medio de cultivo líquido

Después de analizar los resultados obtenidos, el medio elegido para el cultivo de *Aspergillus giganteus* MDH 18894 fue el denominado medio 4, que si bien no fue en el que se obtuvieron

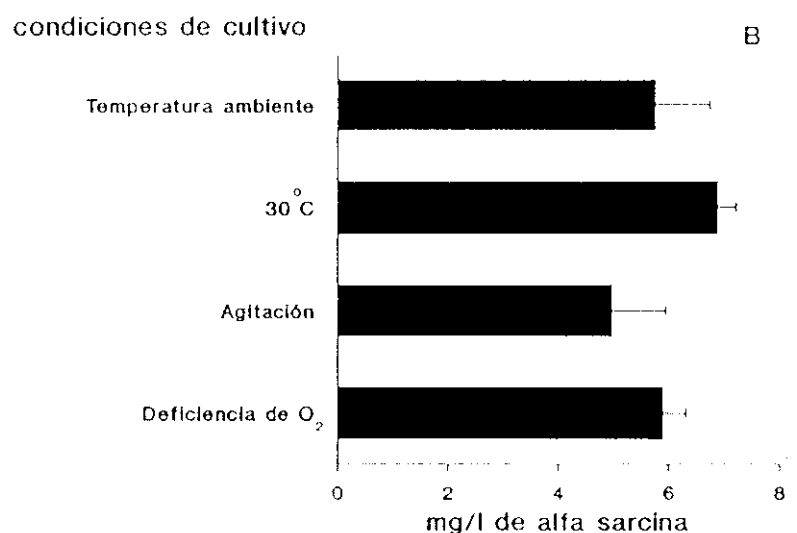
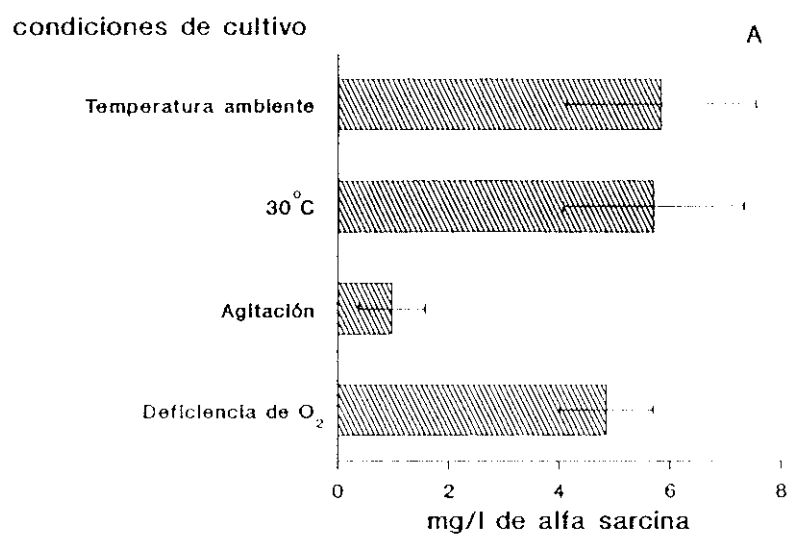


Fig.3.18. Concentración máxima de α -sarcina detectada en los medios de cultivo

En la figura se representa, a modo de barras, el valor máximo de α -sarcina detectada por radioinmunesayo y expresado en mg/l, entre los días 7 y 9 de cultivo como media aritmética de los valores obtenidos en todos los medios de cultivo y en función de las distintas condiciones de cultivo. La figura A) representa los valores obtenidos en los medios de cultivo que incluyen en su composición peptona tripsica de caseína (medios 1,2,3 y 6), mientras que B) corresponde con los medios que no la contienen (medios 4 y 5). En todos los casos se representa la desviación estándar de cada uno de los valores. El procedimiento experimental del radioinmunoensayo se recoge en el apartado 2.8.2.1. y la composición de los medios de cultivo en la tabla 2.6.

las mayores cantidades de proteína, sí fue el que presentó una menor variabilidad de los distintos parámetros examinados (ver fig. 3.12.). Por otro lado, no se observaron fluctuaciones significativas en la concentración de α -sarcina después de que se alcanzaba el valor máximo a los 7 días de cultivo.

Las condiciones de cultivo seleccionadas fueron temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), sin aireación suplementaria y sin agitación.

Los resultados obtenidos en estos experimentos permitieron comprobar que con la Maizena como fuente de carbono, y con el Bovril como fuente de nitrógeno, se obtiene un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del hongo y para la producción de la proteína. Los datos de producción de proteína fueron corroborados en cultivos de 250 ml, de 4 litros, e incluso de 40 litros, donde se han llegado a obtener cantidades considerables de α -sarcina. Este hecho apoya la idea inicial de obtener un medio de cultivo más económico que puede ser utilizado a nivel industrial.

3.1.3. Producción de α -sarcina por las distintas estructuras de *Aspergillus giganteus* MDH 18894

En la figura 3.19., se recoge el valor de la concentración de α -sarcina obtenida por RIA en los medios de cultivo líquido sembrados a partir de fracciones enriquecidas en esporas, conidióforos e hifas de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, según se describe en el apartado 2.2.7., así como el aspecto que presentaban al microscopio las 3 fracciones purificadas. Los cultivos se realizaron en las condiciones descritas en el apartado anterior y fueron crecidos durante 24 horas.

Como puede observarse, sólo en los cultivos sembrados a partir de esporas se detectó la presencia de α -sarcina, a una concentración de 1.4 mg/l. Los valores obtenidos en los cultivos sembrados con conidióforos y con hifas, estuvieron por debajo del nivel de detección del radioinmunoensayo.

Aunque este experimento no se realizó un número suficiente de veces como para poder hacer una estimación estadística de los resultados, no fue posible determinar con exactitud cual es la estructura implicada en la producción de la proteína, si permitió apoyar la hipótesis de que su producción está relacionada con los procesos de esporulación. Como ha sido referido en el análisis de los resultados obtenidos de la determinación de la cantidad de proteína en los distintos medios de cultivo, las concentraciones máximas de proteína se obtuvieron cuando el hongo estaba en dicha fase de su crecimiento.

3.2. Purificación de las toxinas

3.2.1. Purificación de la α -sarcina

El primer método de purificación de la α -sarcina a partir del medio de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894, fue descrito por

estructura

cantidad de
 α -sarcina
(mg/l)



Esporas

1.4



Conidióforos

n.d.



Hifas

n.d.

Fig.3.19. Concentración de α -sarcina obtenida por radioinmunoensayo en medios de cultivo sembrados con fracciones enriquecidas en cada una de las estructuras del hongo

En la figura se recoge, junto a las fotografías realizadas a microscopio óptico de cada una de las fracciones, la concentración de α -sarcina observada en los medios de cultivo sembrada con cada una de las fracciones y tras 24 horas de cultivo. Los valores han sido estimados por radioinmunoensayo y en los casos de los medios sembrados con la fracción de conidióforos y de hifas, el valor obtenido está por debajo del nivel de detección del radioinmunoensayo, lo que se indica como N.D. La obtención de cada una de las fracciones referidas se recoge en el apartado 2.2.7. y el método de radioinmunoensayo en el apartado 2.8.2.1.

Olson y Goerner en 1965 (40). En este método se aprovechaba el carácter básico de la proteína y su carga neta positiva a pH neutro, que le permite interaccionar con resinas de intercambio catiónico, tales como la Amberlita IRC 50.

La fracción retenida en Amberlita IRC 50, era sometida a una segunda cromatografía en Amberlita XE63 (40), de la cual se obtuvieron las muestras de α -sarcina que han permitido, a lo largo de estos años, llevar a cabo los distintos estudios realizados con la proteína.

En 1984, cuando en el laboratorio de la Sección de Inmunología del Departamento de Investigación del Hospital "Ramón y Cajal" se puso a punto el cultivo de la cepa de *A. giganteus*, y tras comprobar la presencia de α -sarcina en el medio de cultivo, se llevó a cabo una revisión del proceso de purificación (232).

En un primer momento, se conservó como primer paso de purificación la cromatografía en Amberlita IRC 50, de manera que el medio de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894 era filtrado a través de lana de vidrio para eliminar el micelio del hongo y centrifugado a 13.000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de la centrifugación era aplicado en una columna de Amberlita IRC 50 equilibrada en 0.2 M fosfato sódico, pH 6.8 y el material pegado a la resina era eluido con 1 M HCl. El primer pico eluido de Amberlita IRC 50 era concentrado y sometido a filtración en una columna de Biogel P-10 (Bio-Rad), equilibrada en 0.15 M NaCl (232).

Este método permitió la purificación de una proteína que fue identificada como la α -sarcina descrita por Olson y col (40). Pero el rendimiento de purificación obtenido resultó muy bajo si se tiene en cuenta la concentración de α -sarcina detectada en el medio de cultivo, por lo que fue necesario poner a punto un nuevo método de purificación.

3.2.1.1. Obtención del medio de cultivo libre del micelio de *Aspergillus giganteus* MDH 18894

A los trece días de iniciado el cultivo en medio líquido del *Aspergillus giganteus* MDH 18894, éste se dió por finalizado y se añadió mertiolato (timerosal) de Merck, a una concentración final de 0.01% v/v (a partir de una concentración al 1% p/v preparada en agua destilada). El medio de cultivo se incubó con el mertiolato durante 2 horas.

Previamente, se había comprobado si esta concentración de 0.01% v/v de mertiolato era suficiente para inactivar el micelio de *A. giganteus*. Para ello, se llevaron a cabo distintos experimentos en los que alícuotas de medio de cultivo fueron tratadas con este agente a concentraciones comprendidas entre 1% p/v y 0.001% p/v.

Las muestras de cultivo fueron incubadas durante periodos de 1 hora y 2 horas, tras lo cual se sembraron en placas de agar Malta, comprobándose que, al cabo de 3 días, las alícuotas tratadas durante 1 hora con concentraciones de mertiolato comprendidas entre 1% p/v y 0.01% p/v, no presentaban ningún

crecimiento.

La filtración a través de papel de filtro y la centrifugación a 15.000 g, a 4 °C durante 20 minutos, permitió obtener un sobrenadante transparente de color marrón, libre de micelio y de restos del medio de cultivo.

Este sobrenadante fue analizado en PAGE-SDS (fig. 3.27. A, pocillos 4 y 5) y en inmunodifusión radial o Mancini contra un antisuero anti- α -sarcina (fig. 3.26. A). En el gel de poliacrilamida puede observarse, entre otras numerosas bandas, la presencia de una banda correspondiente a la α -sarcina, y en el Mancini, la aparición de una reacción específica del medio de cultivo con el antisuero.

3.2.1.2. Cromatografía en resinas de intercambio iónico

Como ha sido referido en el apartado 2.6.1.1., el medio de cultivo presentó un valor de pH de aproximadamente 7, por tanto, y debido a que la purificación de la α -sarcina se llevó a cabo utilizando resinas equilibradas en tampón 0.025 M ácido acético acetato sódico (AcH/AcNa) pH 4.5, se añadió al sobrenadante obtenido de la centrifugación, ácido acético glacial hasta un valor de pH próximo o igual al del tampón.

El sobrenadante se cargó en una columna de DE 23 celullose, equilibrada en tampón 0.025 M AcH/AcNa, pH 4.5 y el material retenido se eluyó con una solución de AcH 1M. Ambas fracciones, retenida y no retenida en DE 23 celullose, se aplicaron en inmunodifusión y en PAGE-SDS según se recoge en las figuras 3.26. B y 3.27. A. Este análisis, permitió comprobar que la α -sarcina no queda retenida en la columna de DEAE 23 celulosa, mientras que sí lo hacen otras proteínas del medio de cultivo que presentan carácter ácido y alto peso molecular (fig. 3.27. A., pocillo 6) y no reacción con el antisuero contra la α -sarcina (fig. 3.20. B. pocillo 6). También puede observarse cómo gran parte del material coloreado del medio de cultivo del hongo queda retenido en la matriz (fig 3.27. A. pocillo 6).

El medio de cultivo, tras la cromatografía en DE 23 celullose, fue cargado en una columna de CM 23 celullose, equilibrada en el mismo tampón, AcH/AcNa 0.025 M, pH 4.5. La columna se eluyó con un gradiente de fuerza iónica, según se describe en el apartado 2.6.1.3. Tras aplicar el gradiente, el material retenido en la columna se distribuyó en varias fracciones, como se recoge en la figura 3.20.

Estas fracciones fueron analizadas también en PAGE-SDS y en inmunodifusión radial o Mancini, en donde se pudo comprobar (ver fig. 3.20. y fig. 3.21.), que la proteína se distribuía mayoritariamente en las fracciones 5 y 6, en las que se observa el mayor porcentaje de material reactivo con un antisuero α -restrictocina. Las fracciones 4 y 7, contenían una pequeña cantidad de proteína.

Las fracciones 5 y 6 fueron recogidas conjuntamente y sometidas a una segunda cromatografía en la misma columna y en idénticas condiciones, con el objeto de aumentar el grado de pureza de las muestras. El perfil cromatográfico de la columna,

Fig. 3.20. Cromatografía de intercambio iónico en CM 23 cellulose del medio de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894 del material no retenido en DE 23 cellulose

Este material fue cargado en una columna de CM 23 cellulose, equilibrada en tampón 0.025 M, pH 4.5 y que fue eluida con un gradiente de fuerza iónica (apartado 2.6.1.3.) aplicado a partir de la fracción 43 (↓). A partir del perfil de elución de la columna, se recogieron independientemente los grupos de fracciones denominados como [1] a [7], que fueron analizados en PAGE-SDS con una concentración del 6% p/v de acrilamida en el gel concentrador y del 12% p/v en el gel separador (apartado 2.3.7.) cuyo resultado se recoge en el ángulo superior izquierdo. Las muestras aplicadas en el gel fueron las siguientes: 1) 100 µl del pico [6], 2) 100 µl del pico [5] y 3) 100 µl de una mezcla de las fracciones que presentaron valores mayores de D.O. a 280 nm de los picos [2], [3] y [4]. En el gel aparecen indicados los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

Figura 3.20.

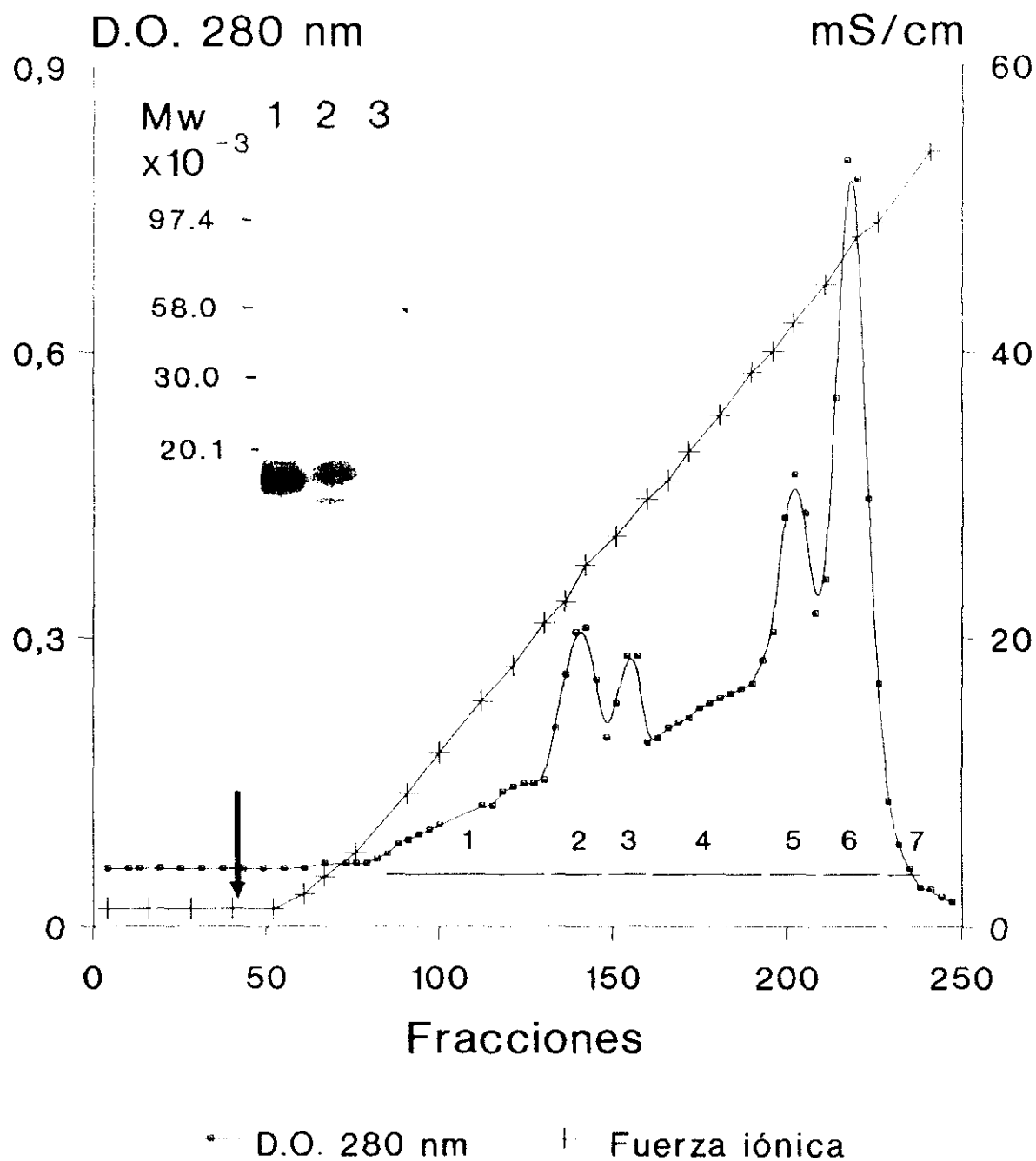


Fig. 3.21. Análisis por inmunodifusión radial simple de las fracciones eluidas de CM 23 celulose con un gradiente de fuerza iónica

La inmunodifusión, cuyo resultado se recoge en B), se lleva a cabo en placas de 1% p/v de agarosa en tampón habitual (apartado 2.5.6.1) con un 10% v/v de antisuero contra la restrictocina. En los pocillos se aplicaron 10 μ l de diluciones sucesivas, con un factor de dilución 1:2 v/v, de las distintas fracciones [1] a [7] definidas en la figura 3.20.. Los pocillos correspondientes a cada fracción aparecen separados por guiones. Como C se señala el pocillo en el que se aplicó una muestra patrón de α -sarcina, a una concentración de 0.1 mg/ml.

En A) aparece representado como barras sobre el perfil de D.O. a 280 nm de la columna de CM 23 celulose (figura 3.20.), el porcentaje de material correactivo con el antisuero detectado en cada fracción, considerando como valor 100% el total del material cuantificada a partir de B) y que ha sido obtenido por interpolación del diámetro de los halos de precipitación de cada muestra en la recta patrón recogida en la figura 2.8.

Figura 3.21.

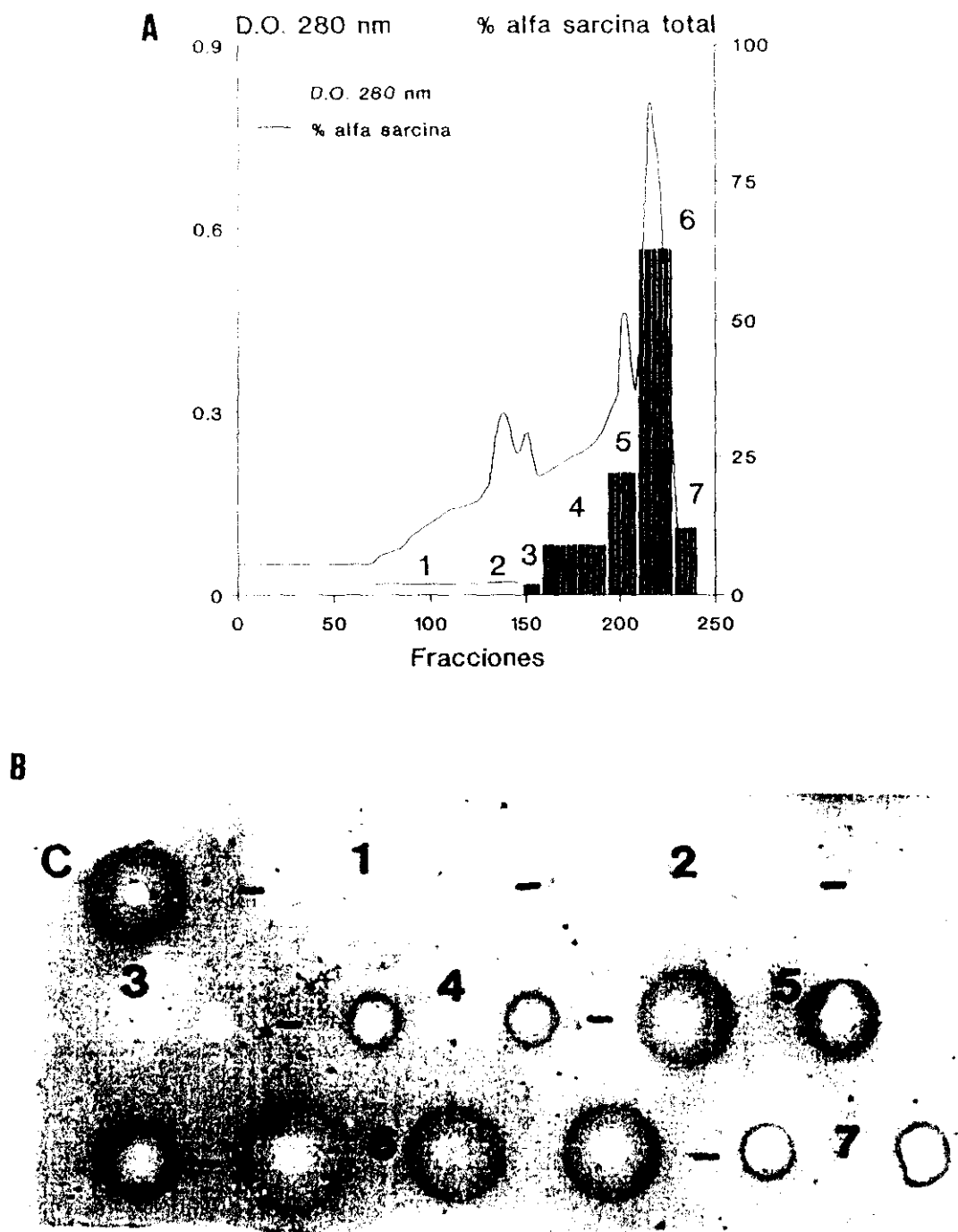


Fig. 3.22. Repurificación de los picos [5] y [6] eluidos de CM 23 celulosa, en iguales condiciones cromatográficas

En la columna de CM 23 celulosa equilibrada en tampón 0.025 M AcH/AcNa pH 4.5, se cargó el material de ambos picos descritos en la figura 3.20., que contenía la mayor parte del material correactivo reconocido por un antisuero específico (figura 3.21.). La cromatografía se desarrolló según se describe en el apartado 2.6.1.3.

El gradiente de fuerza iónica se aplicó a partir de la fracción 55 (↓) y las fracciones eluidas se recogieron en dos grupos denominados picos [1] y [2]. Asimismo, fue recogido un tercer grupo de fracciones, denominado pico [3], que contenían el material no retenido por la columna.

Figura 3.22.

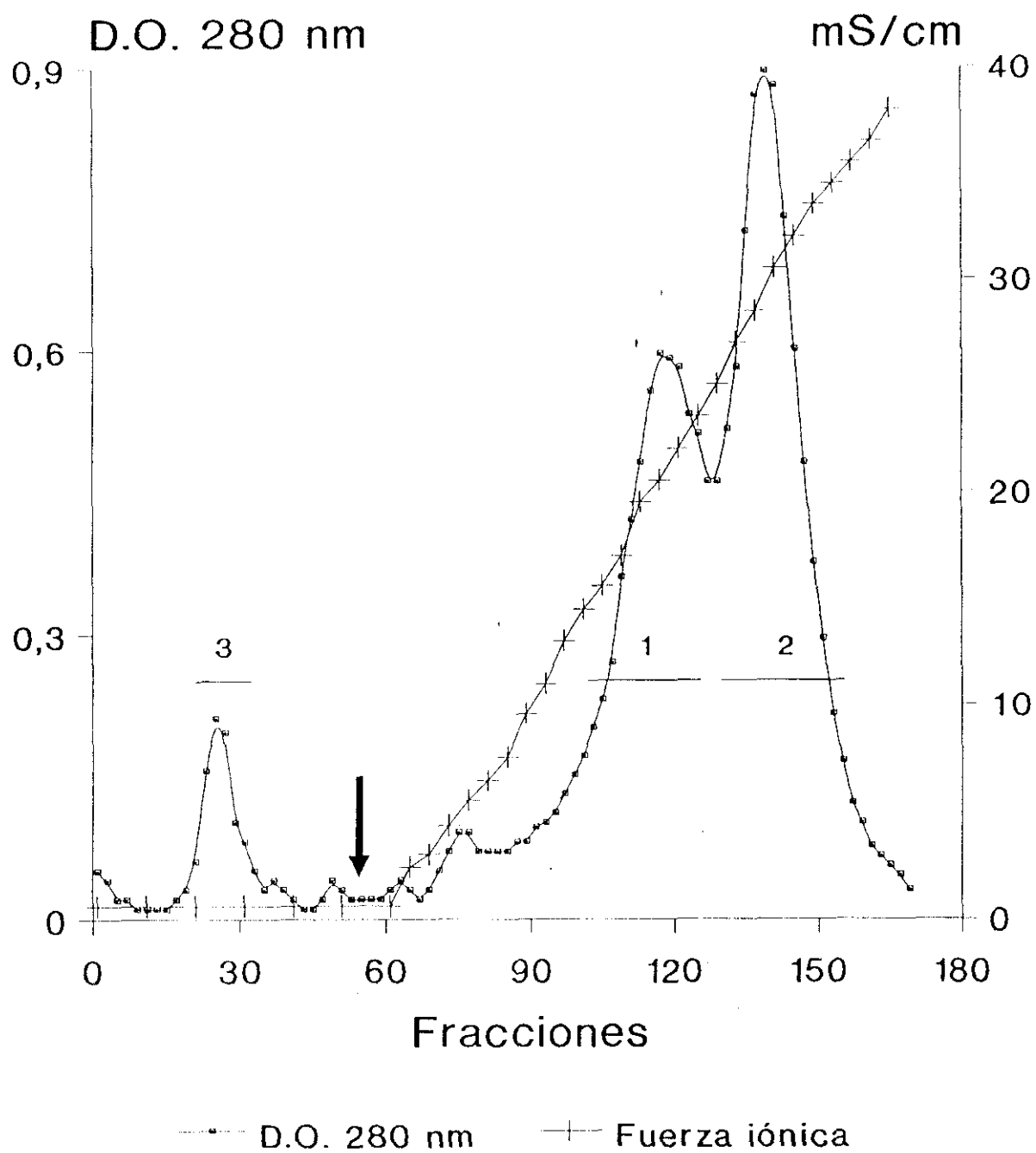
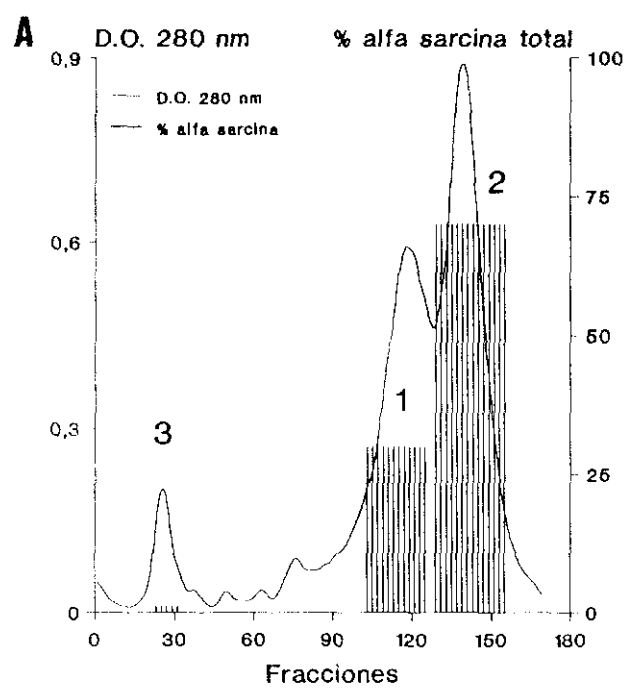


Fig. 3.23. Análisis por inmunodifusión radial simple de los picos [1] a [3] eluidos de CM 23 cellulose con un gradiente de fuerza iónica

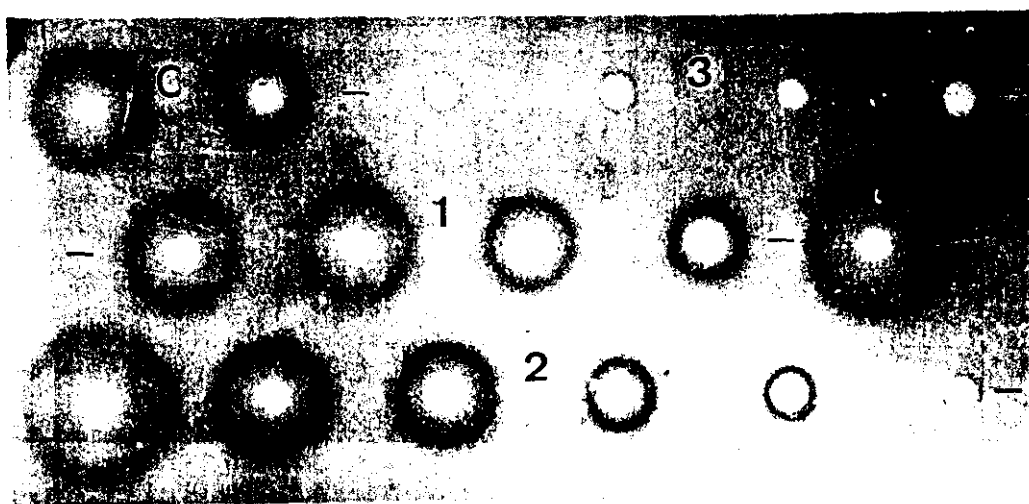
La inmunodifusión, cuyo resultado se recoge en B), se llevó a cabo en placas de 1% p/v de agarosa en tampón habitual (apartado 2.5.6.1) con un 10% v/v de antisuero contra la restrictocina. En los pocillos se aplicaron 10 μ l de diluciones sucesivas, con un factor de dilución 1:2 v/v y por duplicado, de los picos [1] a [3] que han sido definidos en la figura 3.22.. Los pocillos correspondientes a cada pico aparecen separados por guiones. Como C se señalan los pocillos en los que se aplicó una muestra patrón de α -sarcina, a una concentración de 0.1 mg/ml (izquierda) y 0.05 mg/ml (derecha).

En A) aparece representado como barras sobre el perfil de D.O. a 280 nm de la columna de CM 23 cellulose (figura 3.22.), el porcentaje de material correactivo con el antisuero detectado en cada pico, considerando como valor 100% el total del material cuantificado a partir de B) y que ha sido obtenido por interpolación del diámetro de los halos de precipitación de cada muestra en la recta patrón recogida en la figura 2.8.

Figura 3.23.



B



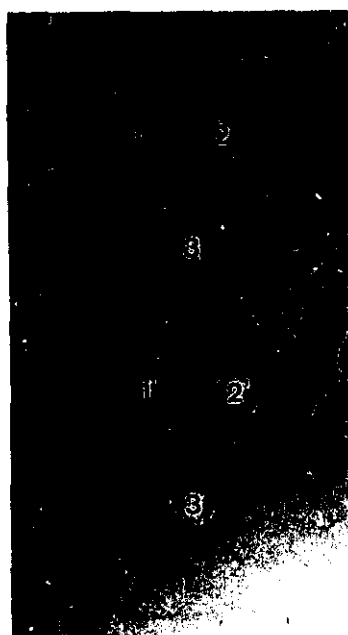


Fig. 3.24. Análisis por inmunodifusión radial de los picos [1] y [2] eluidos de CM 23 cellulose con un gradiente de fuerza iónica

Las muestras fueron aplicadas en placas de agarosa al 1% p/v en el tampón habitual (apartado 2.5.4.1.). En los pocillos numerados como 1 y 1', se aplicaron 1.5 μ g y 1 μ g, respectivamente del pico [2] eluido de CM 23 cellulose (figura 3.22.), en los numerados como 2 y 2', se aplicaron 1.5 μ g y 1.5 μ g, respectivamente del pico [1] de la cromatografía referida y, en los pocillos numerados como 3, se aplicaron 50 μ l de un antisuero de conejo contra la α -sarcina.

se representa en la figura 3.22., en donde puede observarse como el material retenido se distribuye en dos fracciones mayoritarias: una primera fracción que eluye a una fuerza iónica media de 22.5 mS/cm, y una segunda, que eluye a una fuerza iónica media de 35.6 mS/cm.

Ambas fracciones presentaron reacción cruzada con el antisuero contra la α -sarcina en inmunodifusión (ver fig. 3.24.) y cuando se analizan en PAGE-SDS, la segunda fracción presentó una única banda en gel, correspondiente con el peso molecular de la α -sarcina, mientras que la primera fracción, además de la banda de aproximadamente 17.000 de peso molecular, mostró la presencia de una banda de más bajo peso molecular (ver figura 3.20.).

La cantidad de material reconocido por el antisuero específico en cada una de las fracciones obtenidas en la repurificación de la α -sarcina, fue determinada por manciní directo (ver fig. 3.23.). Así, de los 60 mg de material aplicados en la columna de CM 23 celullose y reconocido por el antisuero, un total de 0.035 mg se detectaron en el material no retenido por la resina, que suponen un 0.04% del total cargado, mientras que el primer pico, contiene 18.01 mg de material, un 30.03% del total del material, y el segundo pico contiene 41.92 mg, lo que representa un 69.92% del total de la proteína, calculado según la recta partón recogida en la figura 2.8..

3.2.1.3. Filtración en Sephadex G-10

La fracción segunda de CM 23 celullose, fue concentrada bajo atmósfera de nitrógeno en una célula de ultrafiltración de Amicon de 450 ml, a través de una membrana YM2, hasta un volumen inferior a 50 ml y se cargó en una columna de Sephadex G 10, equilibrada en 0.005 M ClNa, que permitió eliminar el exceso de sales con que eluye la proteína de la resina de intercambio aniónico. El perfil cromatográfico obtenido se recoge en la figura 3.25.

Como puede observarse, la proteína eluyó de la columna de Sephadex G-10 en volumen excluido, ya que esta resina presenta un rango de fraccionamiento para moléculas con un peso molecular inferior a 700. Debido a la alta concentración de iones acetato, la muestra eluye con un pH próximo a 4; esta elevada concentración de iones puede hacer que, durante la liofilización, el pH de la solución disminuya hasta valores excesivamente ácidos y que la proteína puede desnaturarse o agregarse. Por tanto, el pH de la solución se elevó hasta un valor de aproximadamente 6, con la adición de NaOH.

Según ha sido referido en algunos ocasiones (451), la liofilización de las muestras de proteínas puede inducir su agregación, por lo que, parte de la α -sarcina liofilizada, se resuspendió en agua destilada y se aplicó en PAGE-SDS. Como puede observarse en la figura 3.27. A, pocillos 3 y 7, y en el PAGE-SDS que acompaña a la figura 3.25., la proteína no ve alterada su movilidad y no sufre agregación durante este proceso, sólo cuando se aplicaron cantidades muy elevadas de proteína, del orden de 50 μ g por pocillo, se observó la aparición de material de arrastre.

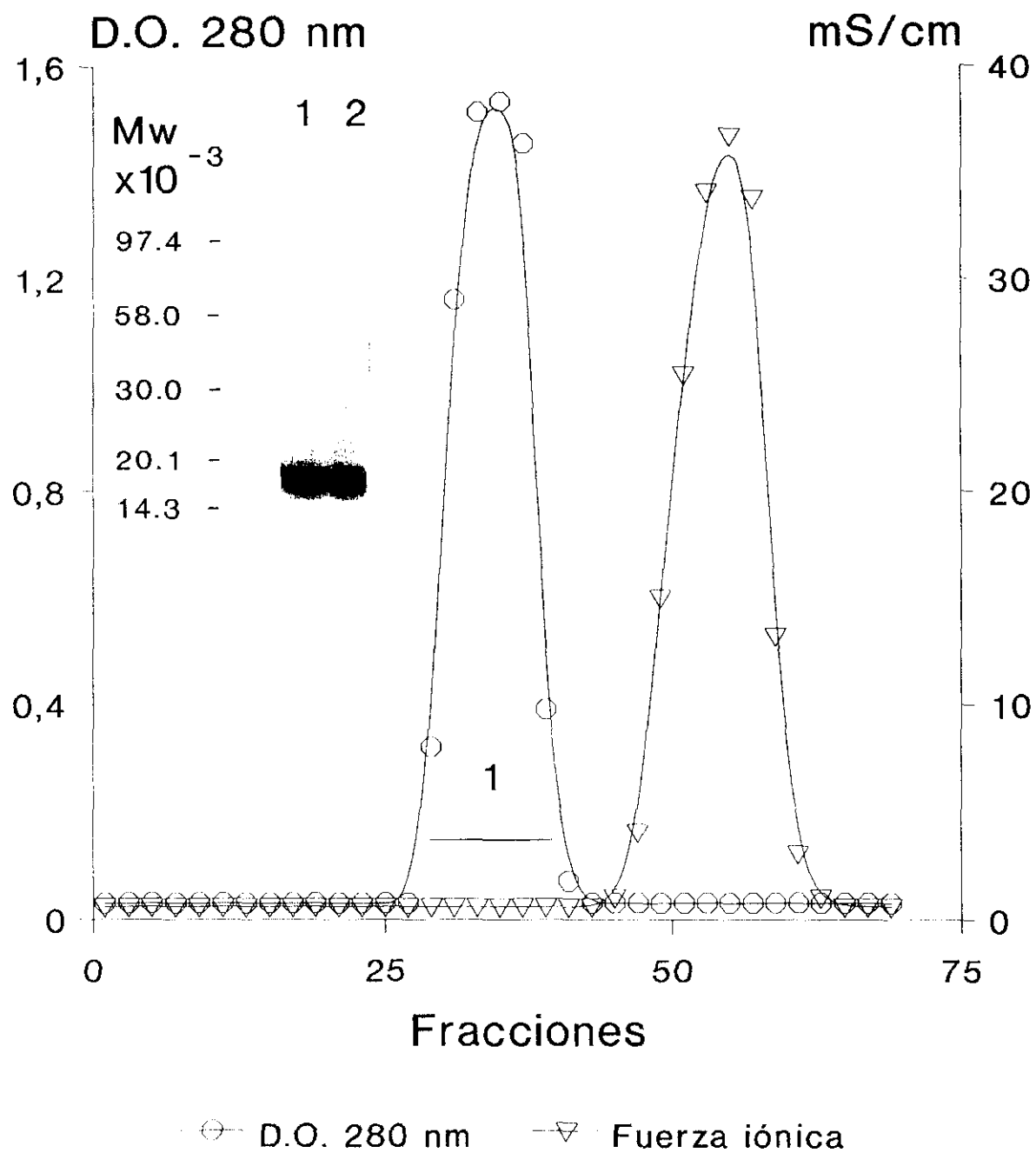
En ninguna de las ocasiones en que se analizaron las

Fig. 3.25. Cromatografía de filtración en Sephadex G-10 del pico [2] eluido de CM 23 cellulose

El material del pico [2], eluido de CM 23 cellulose durante el proceso de repurificación de la α -sarcina (figura 3.23.) y que contenia la mayor cantidad de material reconocido por un antisuero específico (figura 3.24.) fue cargado en una columna de Sephadex G-10 equilibrada en 0.005 M NaCl. A partir del perfil cromatográfico obtenido, se recogieron las fracciones que presentaban D.O. a 280 nm, denominadas como pico [1], que fue procesado segun ha sido descrito en el apartado 2.6.1.4..

Este material fue analizado en PAGE-SDS (ángulo superior izquierdo de la figura) con una concentración de 6% p/v de acrilamida en el gel concentrador y del 12% p/v en el gel separador, en el que se aplicaron las siguiente muestras: pocillo 1) 10 μ g del pico [1] y, pocillo 2) 10 μ g del liofilizado, resuspendido en agua destilada (ver apartado 2.6.2.4.). En el gel se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

Figura 3 25.



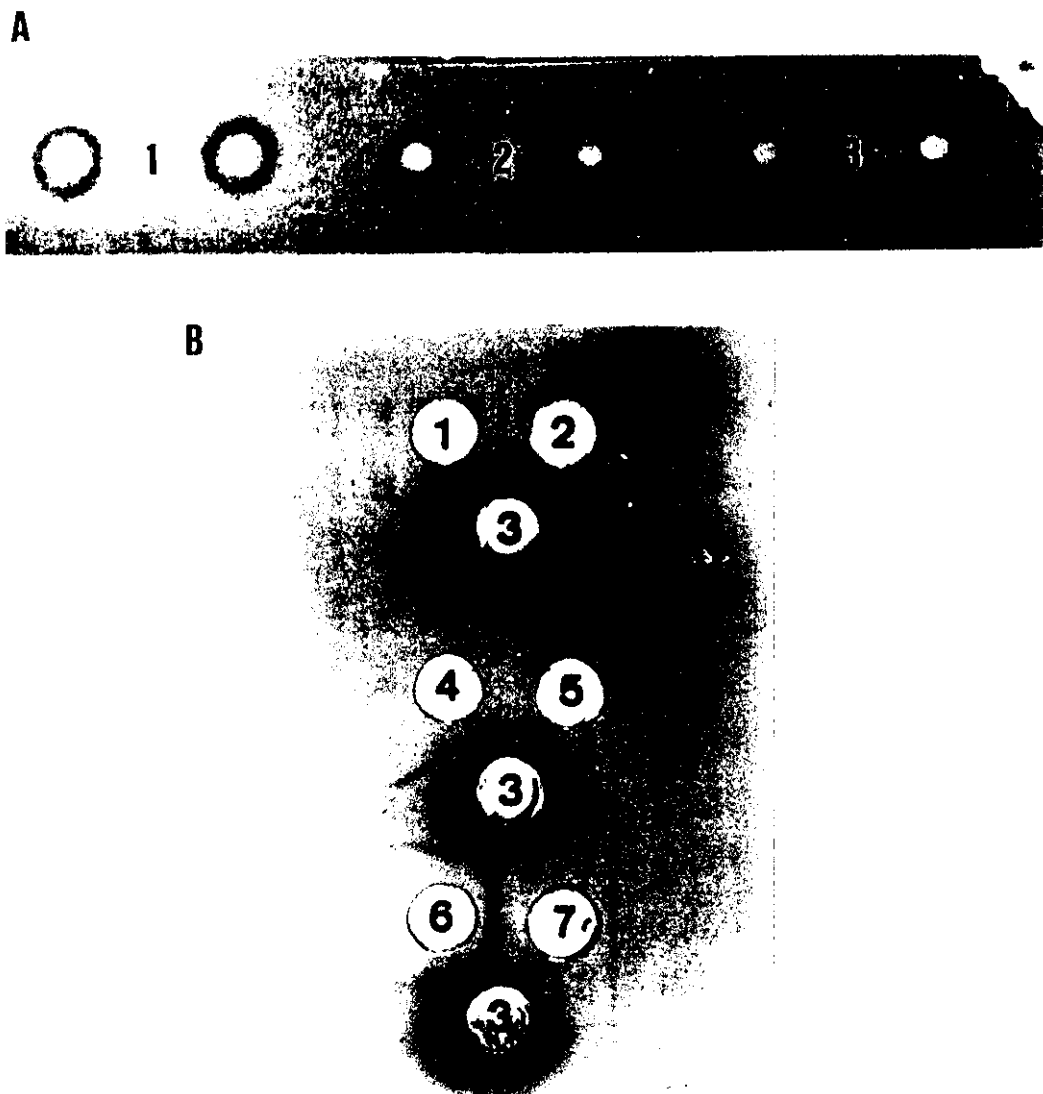


Fig. 3.26. Análisis por inmunodifusión de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la α -sarcina

A) Inmunodifusión radial simple de muestras del medio de cultivo de 3 cultivos diferentes de *A. giganteus* MDH 18894. La inmunodifusión se realizó en placas de 1% p/v de agarosa en el tampón habitual (apartado 2.5.4.3.) con un 10% v/v de antisuero contra la restrictocina. En los pocillos se aplicaron 10 μ l de los medios de cultivo del hongo crecido según se describe en el apartado 2.2.6. Los pocillos correspondientes a cada muestra han sido separados por guiones.

B) Inmunodifusión doble en dos dimensiones. La inmunodifusión se realizó en una placa de 1% p/v de agarosa en tampón habitual (apartado 2.5.4.1.). El pocillo marcado con un 1) contiene una muestra de α -sarcina control, con una concentración de 0.1 mg/ml, los pocillos 2 y 4) contienen una muestras del pico [2] de la repurificación en CM 23 celulose (figura 3.22.) antes de la cromatografía en Sephadex G-10, el pocillo 5) contiene una muestra del material cargado en CM 23 celulose (figura 3.20.), el pocillo 6) contiene el material eluido de DE 23 celulose con ácido acético tras la aplicación del medio de cultivo (ver apartado 2.6.1.2.) y el pocillo 7) contiene una muestra del pico [3], no retenido en CM 23 celulose (figura 3.22.). En todos los casos se aplicaron aproximadamente 4 μ g de proteína. En los pocillos marcado con un 3) se añadieron 50 μ l de antisuero contra la restrictocina.

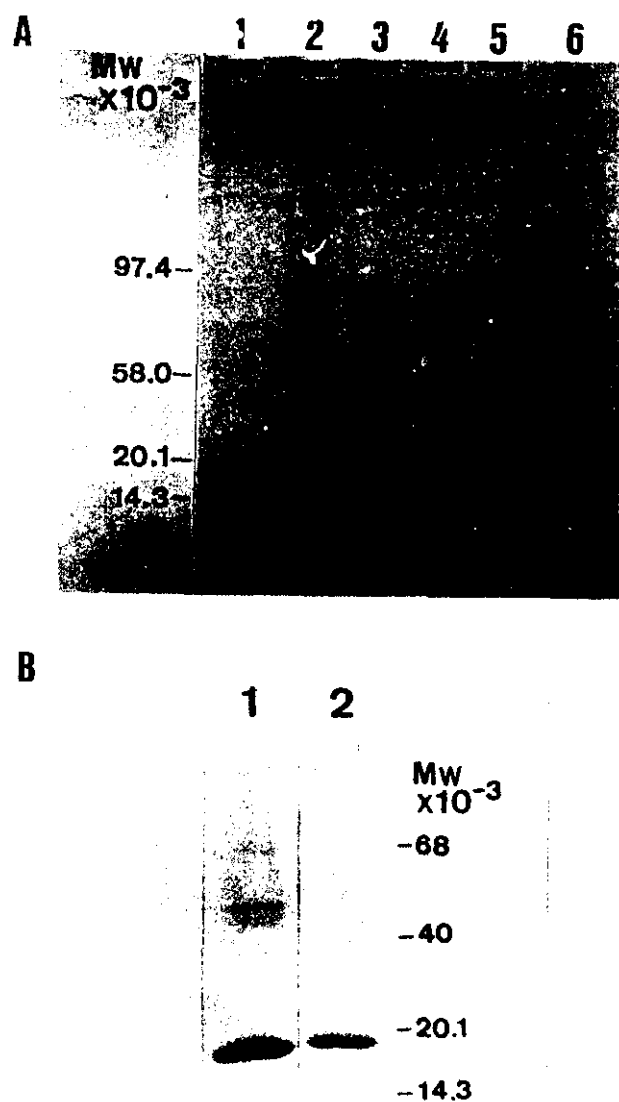


Fig. 3.27. Análisis en PAGE-SDS de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la α -sarcina. Ambos geles contenían una concentración del 6% p/v de acrilamida en el gel concentrador y del 12% en el gel separador (apartado 2.3.7.1.). En los pocillos del gel A) se aplicaron las siguientes muestras: pocillo 1) 10 μ g del pico [1] de la filtración en Sephadex G-10 (figura 3.25), pocillos 2 y 6) 50 y 40 μ g, respectivamente de una muestra de dicho pico [1] liofilizada y resuspendida en agua destilada, pocillos 3 y 4) 100 μ l y 125 μ l, respectivamente, de una alícuota de un medio de cultivo de *A. giganteus* MDH 19984, antes de la purificación de la proteína que fue concentrado aproximadamente unas 50 veces, y pocillo 5) 100 μ l del material eluido de DE 23 cellulose con ácido acético (ver apartado 2.6.1.2.). Los pocillos del gel B) contienen 10 μ g de α -sarcina (pico [1] de la filtración en Sephadex G-10) en el pocillo 1, y 10 μ g de mitogillina en el pocillo 2 (apartado 2.1.1.1.). En ambos casos, se indican los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

muestras de la α -sarcina purificada en nuestro laboratorio, se observó la aparición de agregados de alto peso molecular en los pocillos de los geles de poliacrilamida. Tanto las muestras de mitogillina y de restrictocina, purificadas por Olson y col (40) y de α -sarcina, según refieren Gasset y col (238), presentaron bandas que se correspondían con la presencia de agregados de las aspergilinas en las soluciones (ver figura 3.27. A, pocillo 1 para la mitogillina y figura 3.40. A, pocillo 2, para la restrictocina).

3.2.1.4. Análisis inmunolectroforético de las fracciones eluidas de CM 23 celulose

Las fracciones obtenidas en la segunda cromatografía en CM 23 celulose (figura 3.22.), fueron analizadas mediante dos métodos inmunolectroforéticos distintos utilizando 2 antisueros de conejo distintos, según se recoge en la figura 3.28.

En la figura 3.28. A, aparece el resultado de la inmunolectroforesis cruzada o "Crossed" realizado con una muestra que contenía material de ambas fracciones y un antisuero de conejo contra la proteína purificada (ver apartado 2.5.5.3.). En ella puede observarse como la mayor parte del material está cargado positivamente, apareciendo distintas bandas de precipitación, que presentan reacción cruzada entre ellas. Este hecho indica que existe una heterogeneidad en el material presente en las fracciones eluidas de CM 23 celulosa que resulta, desde un punto de vista inmunológico, difícilmente explicable.

En la figura 3.28. B, se recoge el resultado del análisis inmunolectroforético por la técnica de "Rocket" descrita en el apartado 2.5.5.2., de las dos fracciones separadamente frente a un antisuero de conejo específicos contra la α -sarcina, obtenido por Conde y col (200), utilizando como inmunógeno una muestra de α -sarcina purificada por el grupo de Olson (40).

Ambas fracciones presentan reacción cruzada con el antisuero contra la α -sarcina, siendo mayor la cantidad de material reactivo presente en la fracción segunda, según había sido comprobado previamente por Mancini (ver figura 3.23.). Pudo apreciarse la aparición de reacciones cruzadas parciales entre ambas fracciones, lo que indica la presencia, en la primera fracción de material no presente en la segunda, tal y como había sido comprobado previamente en PAGE-SDS (ver figura 3.20.), así como una pequeña proporción de material de carácter negativo, que aparecen especialmente en la fracción primera frente al antisuero obtenido contra el material eluido de CM 23 celulosa.

3.2.2. Purificación de la ricina

La ricina y su cadena A (RCA) son dos de las toxinas de origen vegetal más utilizadas en la terapia contra tumores (15,21,31).

Durante el trabajo experimental de esta tesis, ambas proteínas han sido utilizadas como toxinas de referencia en la valoración de la actividad de las aspergilinas en distintos

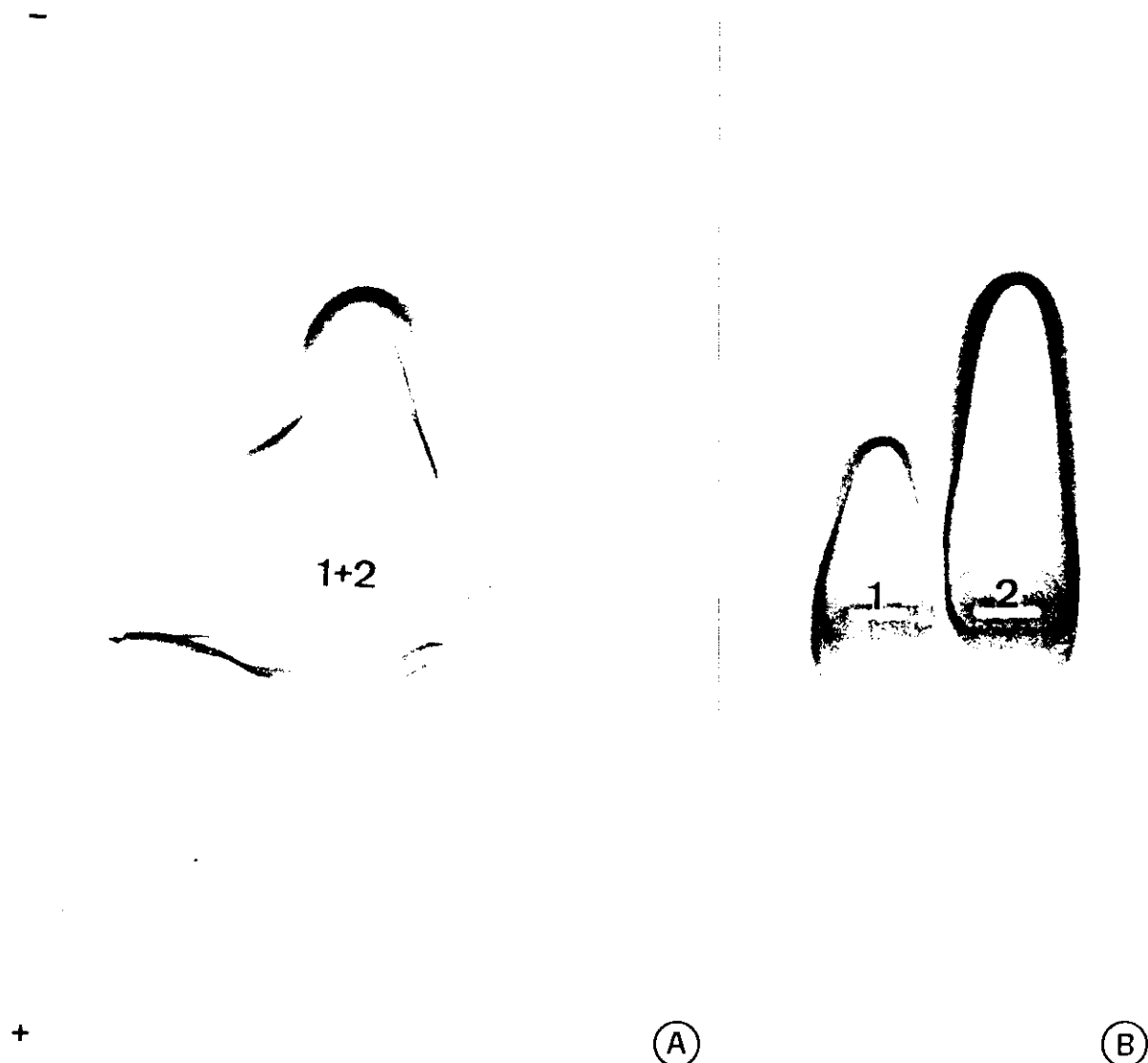


Fig. 3.28. Análisis por inmunolectroforesis de los picos [1] y [2] eluidos de CM 23 celulose durante la repurificación de la α -sarcina

A) Inmunolectroforesis cruzada o "Crossed" de una muestra de 30 μ l del material de los picos [1] y [2] eluidos de CM 23 celulose, segun se recoge en la figura 3.22. (aproximadamente 4 μ g de proteína). Las placas utilizadas contenian un 1% p/v de agarosa en tampón Tris-glicocola (apartado 2.5.5.3.) con un 4% v/v de antisuero de conejo contra la α -sarcina obtenido por Conde y col (200).
 B) Inmunolectroforesis o "Rocket" en placas de 1% p/v de agarosa en tampón habitual (apartado 2.5.5.2) con un 4% v/v de antisuero contra la α -sarcina purificada segun ha sido descrito en esta tesis y obtenido como se describe en el apartado 2.5.1.2. En el pocillo marcado como 1) se aplicaron 4 μ g del pico [1] y en el señalado como 2) 4 μ g del pico [2].

modelos experimentales, tales como la inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de células, su actividad citotóxica, inmunogenicidad, aclaramiento en sangre o biodistribución en tejidos. También ha sido comparada la actividad de los conjugados realizados entre el anticuerpo monoclonal MBr 1 y las toxinas cadena A de la ricina y restrictocina.

3.2.2.1. Cromatografía en Sepharose CL-4B activada con HCl

En el primer paso de purificación de la ricina se aprovecha la actividad lectínica de la cadena B, capaz de interaccionar con los residuos de galactosa de las matrices de agarosa, por los que presenta una elevada afinidad (413). El tratamiento con ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico, de resinas de este tipo, da lugar a la hidrólisis de gran número de uniones, de manera que la matriz expone mayor número de residuos de galactosa, permitiendo, de esta forma, que el rendimiento de purificación de ricina, en estas condiciones, sea mucho mayor (431).

Por tanto, a partir del extracto de semillas de *Ricinus communis* L., precipitado con sulfato amónico al 80 % y resuspendido en volumen mínimo, según se describe en el apartado 2.6.2.1., se procedió a cargar parte de la muestra en una columna de Sepharose CL-4B, tratada previamente con ácido. El material que interacciona con la columna fue eluido con una solución 0.020 M lactosa, en el tampón de equilibrado que fue 0.01 M Tris HCl, pH 8.3, (ver apartado 2.6.2.2.) El perfil cromatográfico obtenido en la columna se recoge en la figura 3.29.

3.3.2.2. Filtración en Sephadex G-100

El material eluido de Sepharose CL-4B tratada con ácido, se cargó en una columna de Sephadex G-100, equilibrada en tampón 0.01 M Tris-HCl pH 8.2, 0.02 M lactosa, con 0.01% de azida sódica p/v. A partir del perfil cromatográfico, que se recoge en la figura 3.30., se definieron dos fracciones que, cuando fueron analizadas en PAGE-SDS, mostraron bandas que se correspondían con las dos toxinas descritas en el extracto de *R. communis* (59,67, 74,75). La fracción segunda o 2, presentaba una banda mayoritaria de peso molecular similar al descrito para la ricina (figura 3.31., pocillo 2), junto con otras bandas que indicaban la presencia de material reducido durante el proceso de purificación, y una banda de alto peso molecular que corresponde con material incapaz de penetrar en el gel y que representaba una contaminación de aglutinina (figura 3.33., pocillo 1).

Las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G-100 que contenían la ricina (fracciones 25 a 39), fueron analizadas en inmunodifusión. Los resultados de estas inmunodifusiones se recogen en la figura 3.31., en donde se observa que sólo desde la fracción 36 a 39, presentan material que reacciona completamente con la ricina.

Para aumentar el grado de pureza de esta muestra, el material obtenido en el segundo pico de Sephadex G-100, se filtró nuevamente a través de la columna en las mismas condiciones. Los perfiles cromatográficos obtenidos en estas filtraciones se

Fig. 3.29. Cromatografía de afinidad en Sepharose CL-4B activada con HCl del extracto de *Ricinus communis* L. precipitado con sulfato amónico

El extracto de *Ricinus communis* L. (apartado 2.6.2.1.) fue cargado en una columna de Sepharose CL-4B activada con HCl equilibrada en tampón 0.010 M Tris-HCl (apartado 2.6.2.2.). El material retenido en la columna fue eluido con 0.020 M lactosa disuelta en el tampón de equilibrado (+) y las fracciones que presentaron D.O. a 280 nm, fueron recogidas independientemente y denominadas como pico [1].

Figura 3.29.

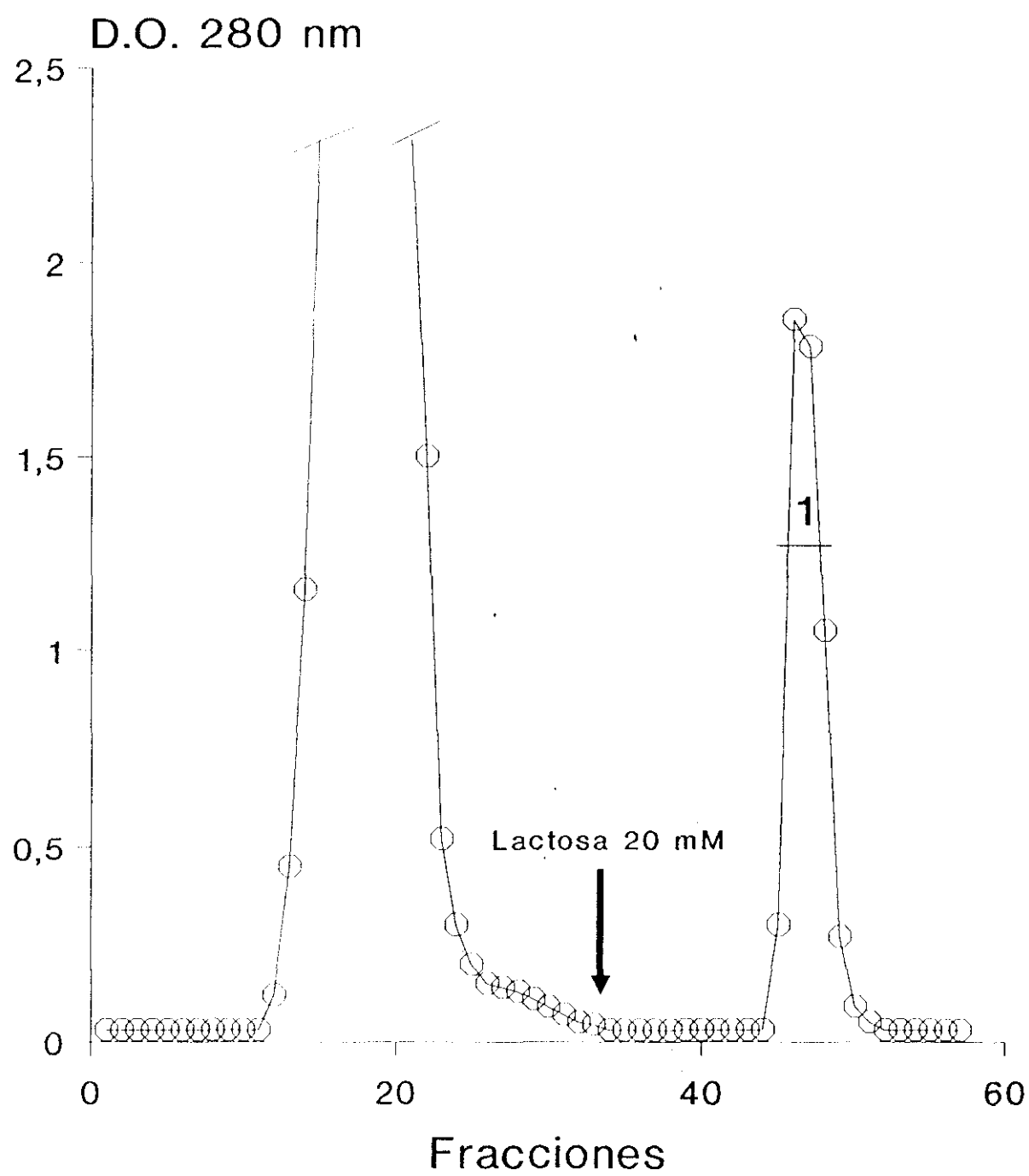
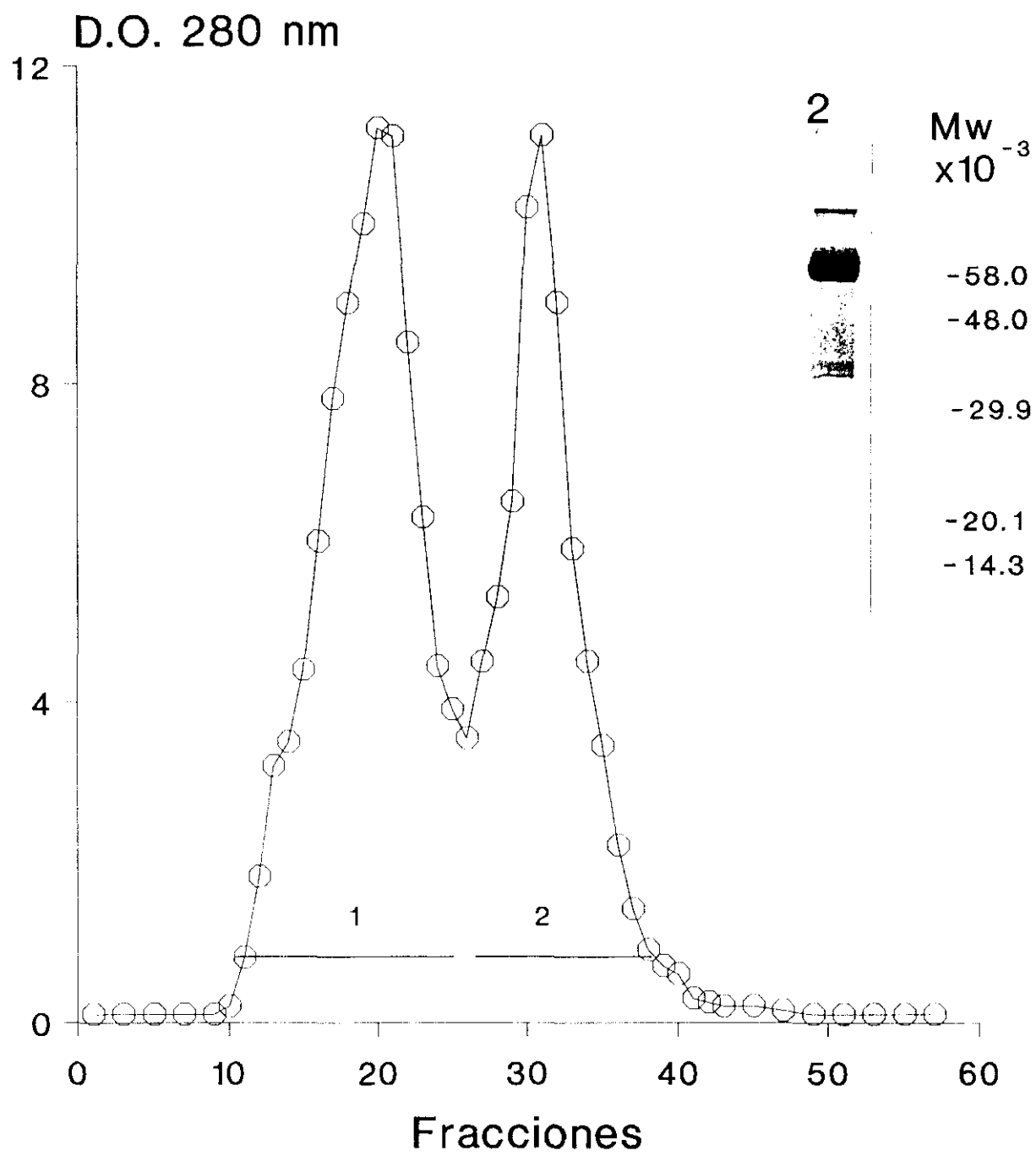


Fig. 3.30. Cromatografía de filtración en Sephadex G-100 del pico [1] eluido de Sepharose CL-4B con lactosa

El pico [1] obtenido en la elución de la columna de Sepharose CL-4B con lactosa (figura 3.29.) fue procesado según se describe en el apartado 2.6.2.2. y aplicado en una columna de Sephadex G-100 equilibrada en tampón 0.010 M Tris-HCl, pH 8.2, 0.02 M lactosa (apartado 2.6.2.3.). El perfil cromatográfico obtenido permitió definir dos grupos de fracciones o picos, denominados [1] y [2]. Una muestra de 20 µg del pico [2] fue analizada en PAGE-SDS (ángulo superior derecho) con una concentración de acrilamida del 5% p/v en el gel concentrador y del 10% p/v en el gel separador (apartado 2.7.3.1.), comprobándose así que este pico contenía, mayoritariamente, la ricina. En el gel se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

Figura 3.30.



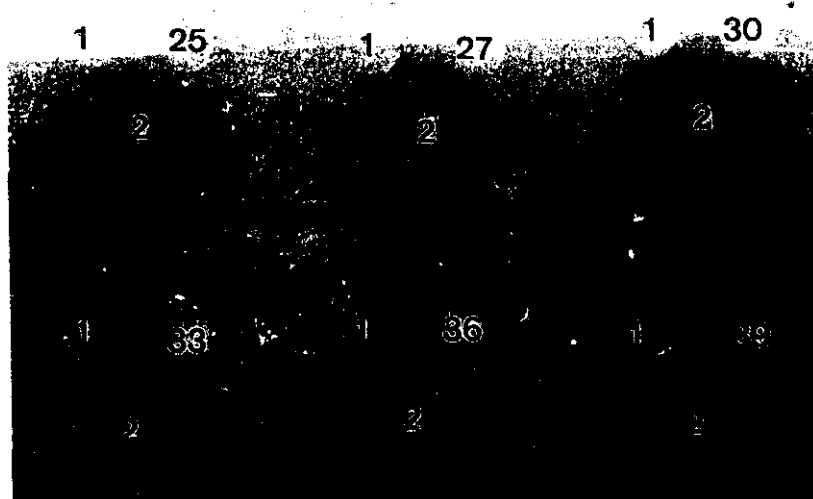
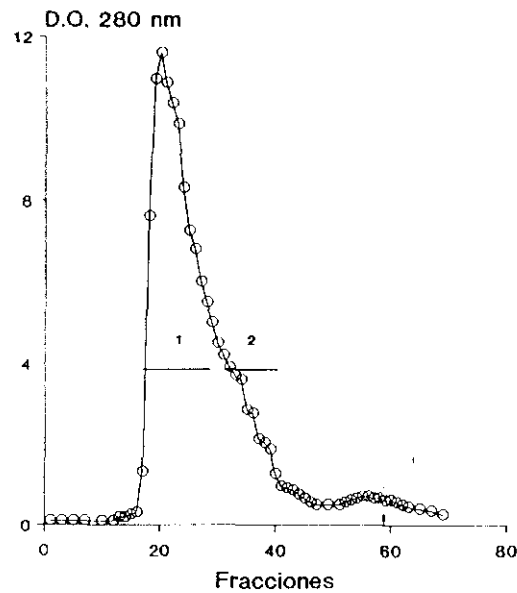


Fig. 3.31. Análisis por inmunodifusión doble de las fracciones eluidas en la filtración en Sephadex G-100 del material previamente eluido con lactosa de Sepharose CL-4B
La inmunodifusión se realizó en placas de 1% p/v de agarosa con un 0.5% de Tritón X-100, en el tampón habitual (apartado 2.5.4.1.). Los pocillos marcados en la fotografía con un 1) contienen 1 μ g de una muestra patrón de ricina, los marcados con un 2) contiene 50 μ l de antisuero de conejo contra la ricina (apartado 2.5.1.3.) y los marcados como 25) a 39) contienen 20 μ l de cada fracción correspondiente (figura 3.30).

A



B

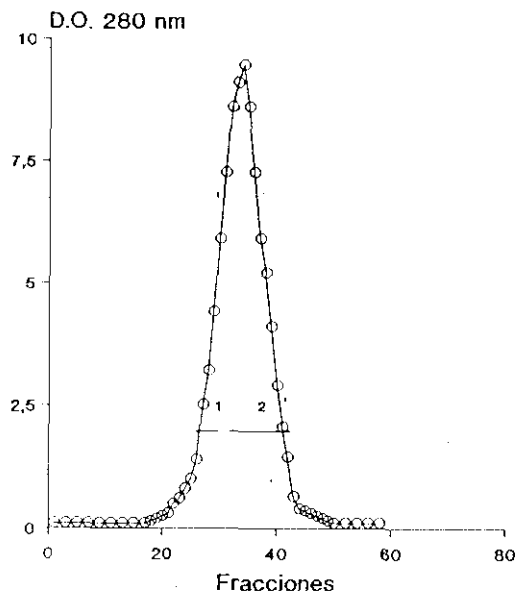


Fig. 3.32. Refiltración de los picos [1] y [2] obtenidos en la filtración en Sephadex G-100

Los picos [1] y [2] de la filtración en Sephadex G-100 del material eluido con lactosa de Sepharose CL-4B (figura 3.30.) fueron sometidos, independientemente, a una segunda filtración en la columna de Sephadex equilibrada en el mismo tampón y desarrollada en iguales condiciones (apartado 2.6.2.3.). En A) aparece el perfil cromatográfico de la refiltración del pico [1], donde se encuentra la aglutinina (ver figura 3.33. A, pocillos 3 y 4), mientras que en B) se recoge la refiltración del pico [2], que contiene la ricina (ver gel de la figura 3.30). Con los números [1] y [2], se señalan en las figuras, las fracciones que fueron recogidas de cada filtración.

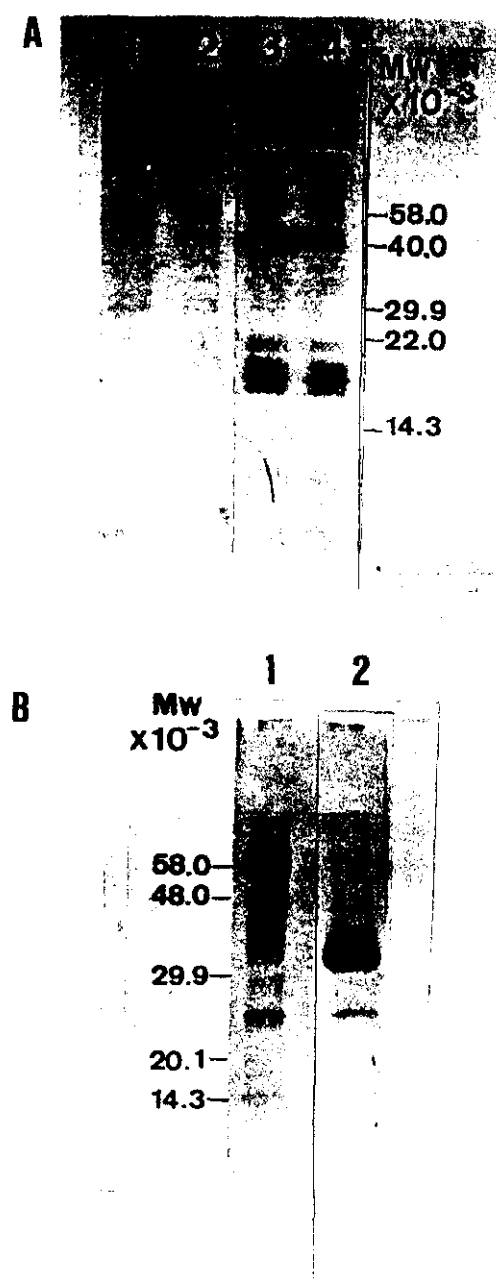


Fig. 3.33. Análisis en PAGE-SDS de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la ricina. Ambos geles contenían una concentración del 5% p/v de acrílamida en el gel concentrador y del 10% p/v en el gel separador (apartado 2.3.7.1.). En los pocillos del gel A) se aplicaron las siguientes muestras: pocillos 1 y 2) 7 μ g y 10 μ g, respectivamente, de una muestra de ricina (perteneciente al pico [2] de la refiltración en Sephadex G-100, figura 3.32. B.) y en los pocillos 3 y 4) 7 y 10 μ g, respectivamente del pico [1] de la primera refiltración en Sephadex G-100 (figura 3.32. A.). En los pocillos del gel B) se aplicaron las siguientes muestras: en el pocillo 1) 25 μ g de ricina (pico [1] de la segunda refiltración en Sephadex G-100, figura 3.32. B.) y en el pocillo 2) 20 μ g del mismo material, tras la reducción con 2- β -mercaptoetanol (apartado 2.6.2.4.) En ambos geles se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

recogen en la figura 3.32., y el análisis de las fracciones en PAGE-SDS en la figura 3.33. A.

En el gel (figura 3.33. A) se puede observar, como la muestra obtenida de ricina, aparece altamente purificada (pocillo 1), distribuyéndose como una única banda de peso molecular superior a 58.000. Cuando la proteína fue reducida en presencia de una concentración de 40 μ M 2- β -mercaptoetanol, se pudieron apreciar dos bandas de pesos moleculares muy parecidos (figura 3.33. B, pocillo 2).

3.2.3. Purificación de la briodina

La briodina fue purificada a partir de un extracto acuoso de las raíces de *Bryonia dioica* Jacq., según el método descrito por Stirpe y col (52). Brevemente, el extracto fue precipitado con sulfato amónico, resuspendido, dializado contra tampón PBS y cargado en una columna de CM-celulosa Fast Flow que fue eluida con un gradiente de fuerza iónica, según se recoge en el apartado 2.6.3.

El perfil cromatográfico obtenido en CM-Celullose Fast Flow, queda recogido en la figura 3.34. junto con el análisis en PAGE-SDS, en presencia de urea 6 M, del material obtenido.

Como puede observarse (figura 3.34., pocillo 1), el material eluido de la columna se distribuye de forma homogénea en un pico, de 30.000 de peso molecular, que se corresponde con la proteína purificada por el grupo de Stirpe (52), que eluye con una fuerza iónica media de 10.5 mS/cm.

Paralelamente a los experimentos de purificación de la briodina, se realizaron extractos, en condiciones similares, de las hojas y de los frutos de la planta, que fueron procesados de igual forma que el extracto de raíces. El material presente en los 3 extractos fue analizado comparativamente en electroforesis en PAGE-SDS con urea 6M, según se recoge en la figura 3.35.

En el pocillo 3 se aplicó una muestra del extracto de hojas de *B. dioica* Jacq., en donde se puede observar una banda de igual peso molecular que la briodina. Esta proteína se corresponde con la toxina denominada briodina-L, caracterizada por Bolognesi y col (65), quienes la consideran como una isoenzima de la briodina aislada de las raíces de la planta, y recalificada como briodina-R.

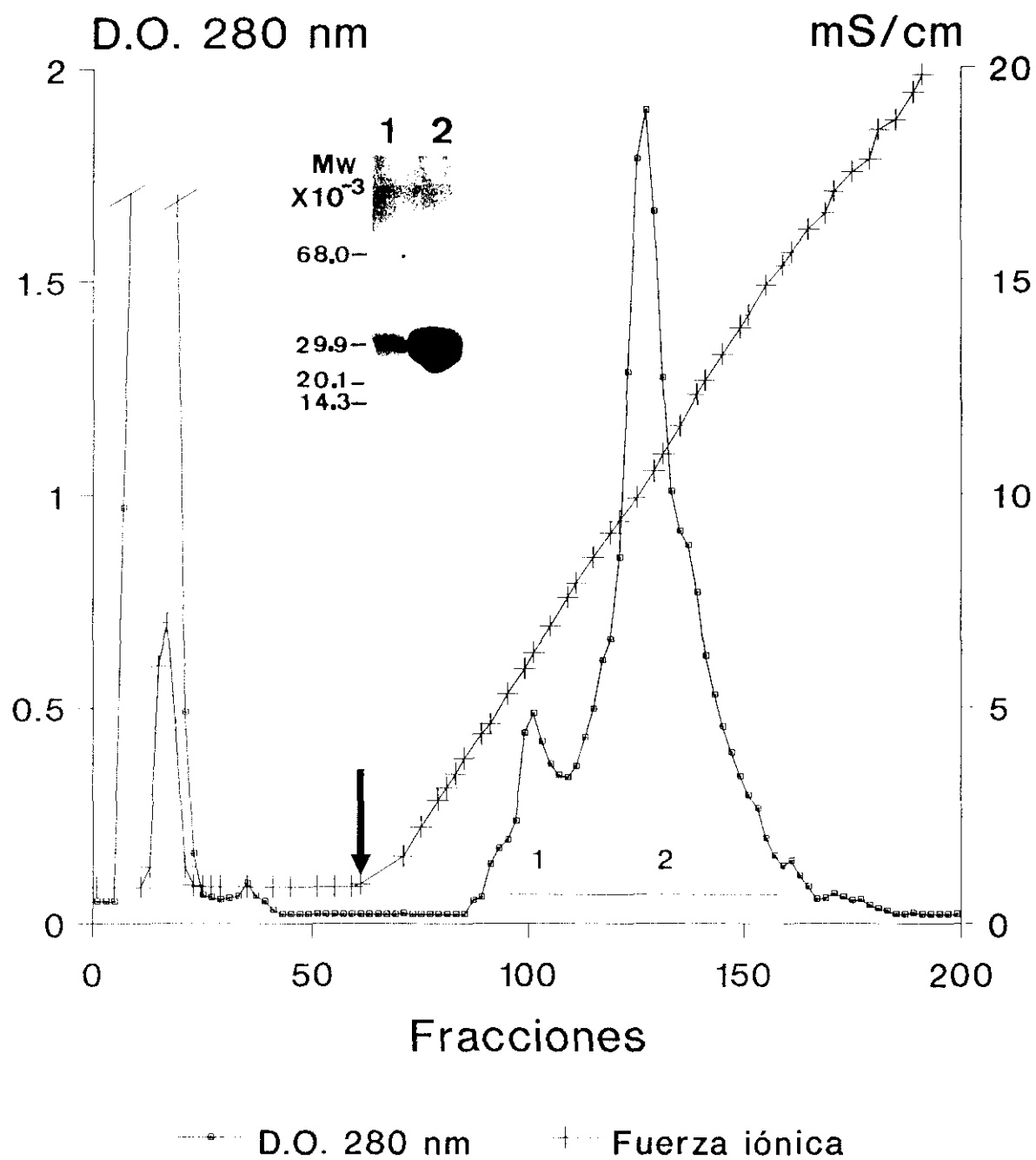
La proteína mayoritaria observada en los frutos (pocillo 1) ha sido purificada e identificada como una proteína denominada bridiofina, que presenta un peso molecular de 65709 ± 2358 , determinado en PAGE-SDS en presencia de urea 6 M (452). La bridiofina resulta altamente tóxica en ratones, en donde presenta un valor de LD₅₀ de 8.8 mg/kg (con un grado de confianza del 95% entre 7.45 y 11.5) de ratón a las 3 horas de la inyección, determinado por el método de Lison (449).

Fig. 3.34. Cromatografía de afinidad en CM-Sepharose Fast-Flow del extracto de las raíces de *Bryonia dioica* Jacq., precipitado con sulfato amónico

El extracto, procesado como se describe en el apartado 2.6.2.1., fue cargado en una columna de CM-Sepharose Fast-Flow, equilibrada en tampón 0.005 M fosfato sódico, pH 6.6 (apartado 2.6.2.2.). La columna se eluyó con un gradiente de fuerza iónica entre 0 y 0.2 M NaCl en el tampón de equilibrio, aplicado a partir de la fracción 65 (↓), recogiendo las fracciones de los picos denominados [1] y [2].

El material de ambos picos fue analizado en PAGE-SDS, en presencia de urea con una concentración del 5% p/v en el gel concentrador y del 10% en el gel separador (apartado 2.3.7.1.). En los pocillos se aplicaron 100 µl de cada uno de los picos. En el gel (ángulo superior izquierdo de la figura) se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

Figura 3.34.



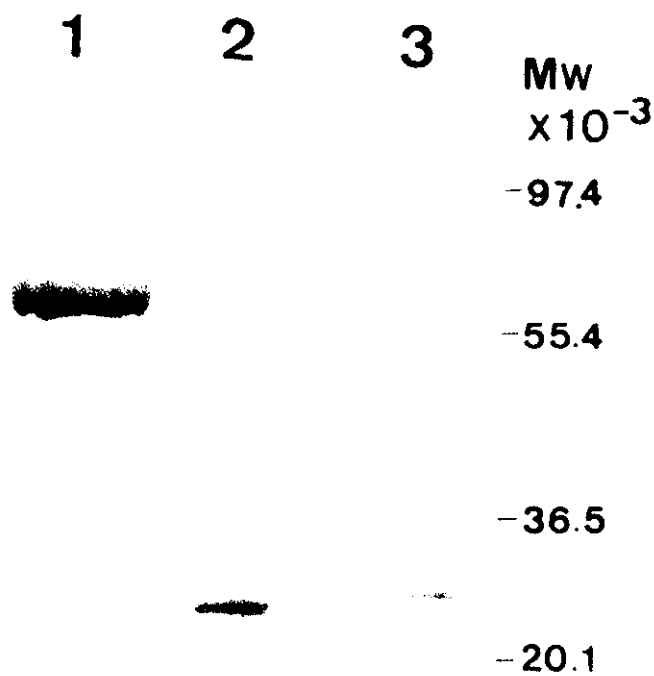


Fig. 3.35. Análisis en PAGE-SDS de muestras de los extractos de raíces y hojas de *Bryonia dioica* Jacq. y de la bridiofina, purificada a partir de los frutos de la planta

Las muestras fueron analizadas en PAGE-SDS, en presencia de urea (apartado 2.3.7.1.) con un 5% p/v de acrilamida en el gel concentrador y de un 10% p/v en el gel separador. El orden de aplicación de las muestras fue el siguiente: pocillo 1) 36 µg de bridiofina, y pocillos 2 y 3) 25 µg del extracto de raíces y del extracto de hojas, respectivamente. En el gel se indica en peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

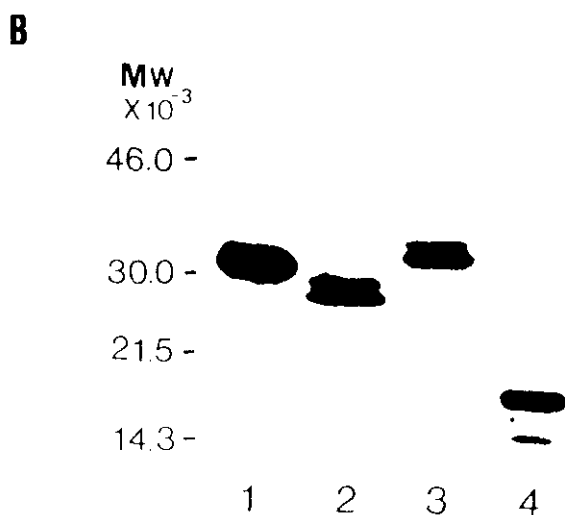
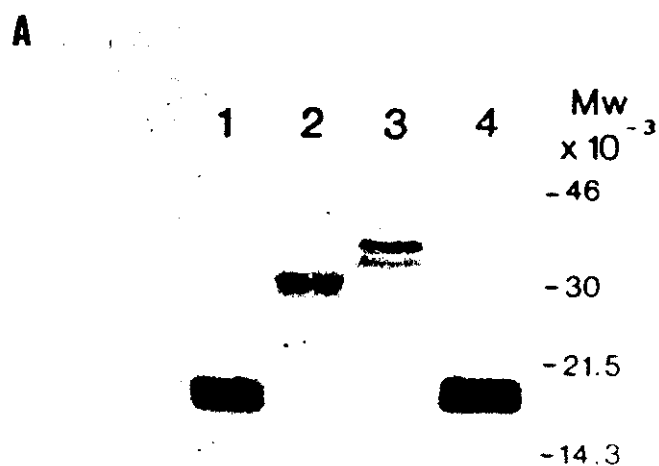


Fig. 3.36. Análisis en PAGE-SDS de las toxinas utilizadas

Las muestras fueron aplicadas en geles de poliacrilamida Phastgel, con un 20% p/v de acrilamida, utilizando un sistema microprocesador automático Phastsystem (apartado 2.3.7.3.). En el gel A) se aplicaron las siguientes muestras: pocillo 1) 3 μ g de restrictocina, pocillo 2) 2 μ g de briodina, pocillo 3) 2 μ g de ricina y pocillo 4) 3 μ g de α -sarcina. En el gel B) se aplicaron 3 μ g de las siguientes proteínas: pocillo 1) gelonina, pocillo 2) proteína antiviral de *Phytolacca americana* (PAP), pocillo 3) cadena A de la ricina (RCA) y pocillo 4) α -sarcina. Las muestras de α -sarcina, ricina y briodina han sido purificadas según se describe en los apartados 3.2.1. a 3.2.3. y las demás proteínas han sido obtenidas según se describe en los apartados 2.1.1.1. y 2.1.1.2.. En los geles se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular y su movilidad.

3.2.4. Análisis comparativo por PAGE-SDS de las distintas toxinas

En la figura 3.36. se recoge el resultado de la electroforesis en PAGE-SDS de las distintas toxinas utilizadas. En el gel denominado como A, se observan las bandas correspondientes a la restrictocina (1), la briodina (2), la cadena A de la ricina (3) y la α -sarcina (4). En el gel denominado como B, aparecen la gelonina (1), la PAP (2), junto con la cadena A de la ricina (3) y la α -sarcina (4). Una muestra de la mitogillina utilizada aparece en el pocillo 1 de la figura 3.27. B. Otros datos sobre la pureza de las muestras de las toxinas utilizadas quedan recogidas en las figuras 3.62. a 3.65., que corresponden con el análisis del material obtenido durante la conjugación de las toxinas con distintos anticuerpos monoclonales.

Todas las muestras presentan una única banda correspondiente con los pesos moleculares conocidos para cada una de las toxinas, excepto la cadena A de la ricina en la que puede observarse la presencia de una pequeña contaminación con la cadena B (pocillo 3 de la figura 3.36. A y B).

3.3. Actividad de las toxinas

3.3.1. Actividad de las toxinas en inhibición de síntesis de proteínas

3.3.1.1. Inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de células

Los estudios sobre la actividad de las toxinas en inhibición de síntesis de proteínas se realizaron en un lisado de reticulocitos de conejo, según se describe en el apartado 2.10.1.1. En todos los casos, las concentraciones de proteína utilizadas estuvieron comprendidas entre 10^{-8} M y 10^{-12} M, rango de concentraciones que permite obtener niveles de inhibición de síntesis de proteínas superiores al 75%.

Las curvas de inhibición obtenidas para la α -sarcina y la mitogillina quedan recogidas en la figura 3.37., junto con la curva de la briodina, y la de la restrictocina, en la figura 3.38. Como puede observarse, con las mayores concentraciones ensayadas (10^{-9} M) las cuatro toxinas presentan porcentajes de inhibición comprendidos entre un 95% y un 100%.

A partir de las gráficas se determinó, para cada una de las muestras, el valor de IC_{50} o concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la síntesis, cuyo resultado se recoge en la tabla 3.1. Las tres aspergilinas utilizadas, presentaron un nivel de inhibición similar, siendo la mitogillina la que ha resultado ligeramente más tóxica ($IC_{50} = 10.0 \times 10^{-12}$ M frente a 37.3×10^{-12} M de la α -sarcina y 47.5×10^{-12} M para la restrictocina).

Este valor de IC_{50} ha sido el término más utilizado en la comparación de la actividad de distintas moléculas en experimentos de inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de

Fig. 3.37. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo de distintas toxinas

En la gráfica se representan las curvas de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo de las toxinas α -sarcina, mitogillina y briodina, expresadas como porcentaje de inhibición de la síntesis con respecto al control, para las distintas concentraciones de proteína ensayadas (log M), según el procedimiento descrito en el apartado 2.10.1.1. Como control de la síntesis de proteínas se consideró el número de cuentas por minuto obtenido cuando el experimento se realiza en ausencia de muestras de toxina.

Tabla 3.1. Inhibición de la síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo de las toxinas

En la tabla se recogen los valores de IC_{50} , o concentración de proteína capaz de inhibir el 50 % de la síntesis de proteínas en un lisado de reticulocitos de conejo, según se describe en el apartado 2.10.1.1. Estos valores han sido obtenidos a partir de las curvas de inhibición, de las que son un ejemplo las recogidas en las figuras 3.37. a 3.39. Las toxinas han sido agrupadas atendiendo a su origen y, en cada caso, se indica el número de veces que el experimento ha sido realizado para cada una de ellas.

Figura 3.37.

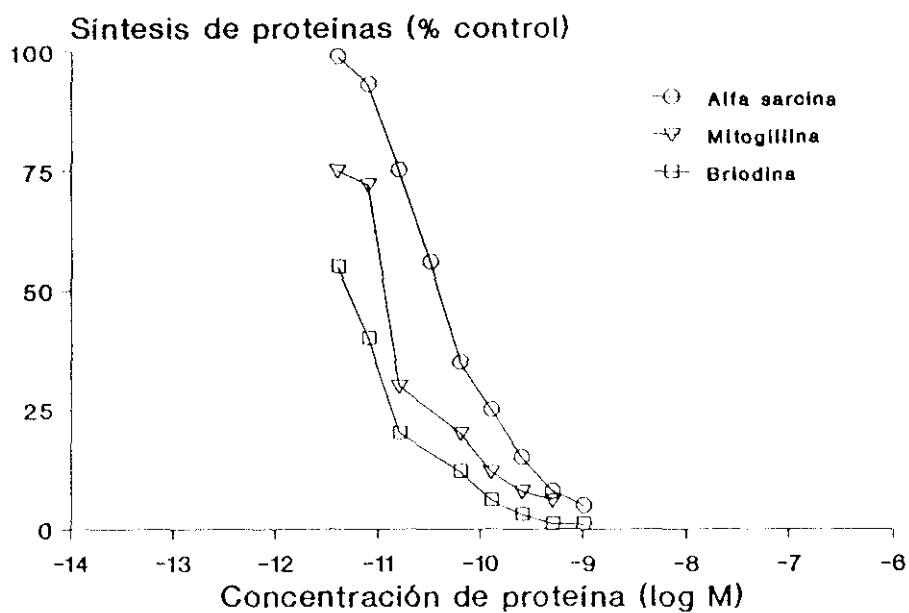


Tabla 3.1.

toxina	número de experimentos	IC ₅₀ (Mx10 ¹²)
toxinas vegetales		
ricina	3	15.8
RCA	6	27.5
briodina	2	10.5
gelonina	2	29.5
PAP	2	4.4
aspergilinas		
α-sarcina	8	37.3
mitogillina	4	10.0
restrictocina	4	47.5

células (362) y en cultivos celulares (8), y puede ser considerado como un término adecuado para llevar a cabo dicha estimación. Por otro lado, en los experimentos realizados no siempre se alcanzó un nivel de inhibición completa de la síntesis de proteínas, aun cuando se utilizaron diluciones similares para todas las muestras por lo que en estos casos, el valor de IC₅₀ resultó útil para evaluar los resultados.

La mayoría de las toxinas presentaron una actividad muy similar, con IC₅₀ comprendidos en el rango de concentraciones de 10⁻¹¹ M. Sólo la PAP, presentó una actividad mayor con un IC₅₀ de 4.40 x 10⁻¹² M. Como ha sido referido en la introducción de esta tesis, las toxinas vegetales compuestas por una sola cadena, han sido comparadas con la cadena A de las holotoxinas o toxinas completas, ya que ambas presentan una actividad similar. En este caso, los valores de IC₅₀ de la ricina y de su cadena A son similares a los obtenidos para la briodina y la gelonina, compuestas por una única cadena polipeptídica, hecho que confirma la similitud existente entre ellas.

Estos resultados están en concordancia con los datos que se conocen sobre la actividad de las toxinas estudiadas, que actúan sobre una región específica del ARNr 28S de los ribosomas eucarióticos (43-47). Según ha sido demostrado por distintos autores, la actividad N-glicosidasa de la ricina, la briodina, la gelonina y la PAP (44,54,65,105) y la actividad fosfodiesterasa atribuida a las aspergilinas (45), presentar una cinética de reacción bastante similar, inactivando un número de ribosomas equivalentes a concentraciones similares (21).

No obstante, como será referido más adelante, la interacción de las toxinas con el Cibacron Blue, permitió el fraccionamiento de algunas de estas muestras, y la obtención de formas moleculares más activas en inhibición de síntesis de proteínas. Este hecho induce a pensar que, aun cuando el sitio y el mecanismo de actuación sean similares, la interacción con el sustrato puede realizarse de forma diferente (453).

Por otro lado, estos experimentos han sido realizados con muestras de α -sarcina purificadas en nuestro laboratorio, por tanto, los resultados demuestran que el método de purificación puesto a punto en este trabajo, permite obtener una proteína actividad, capaz de inhibir la síntesis de proteínas en un sistema libre de células a concentraciones similares a las otras dos aspergilinas purificadas por Olson, y que han sido utilizadas desde 1960 (40).

3.3.1.2. Modificación de la actividad de las aspergilinas tras su reacción con SPDP

Las aspergilinas son proteínas que contienen 4 cisteínas en su cadena polipeptídica (193-196). Estas cisteínas dan origen a dos puentes disulfuro, que confieren a la molécula una estructura de doble lazo. La ausencia de cisteínas libres que puedan ser utilizadas en la conjugación con los anticuerpos monoclonales, hace que sea necesario someter a estas proteínas a reacción química con agentes bifuncionales que introduzcan grupos -SH libres (333).

Figura 3.38.

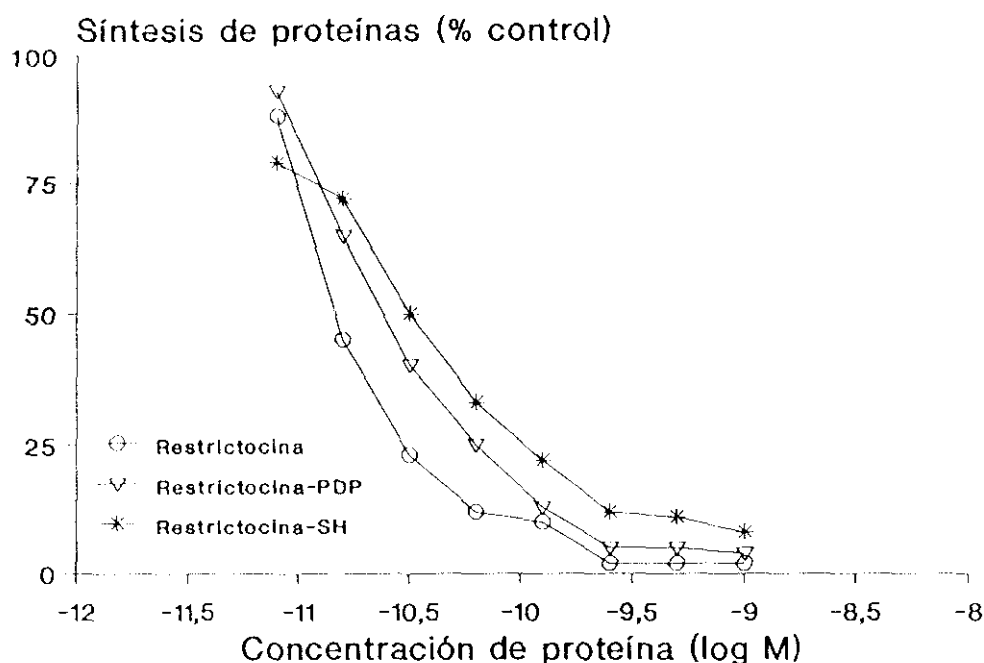


Tabla 3.2.

fracciones	IC ₅₀ (Mx10 ¹²)	actividad (%)
restrictocina	13.6	100
restrictocina-PDP	30.5	91.9
restrictocina-SH	36.0	89.3

Fig. 3.38. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas en sistema libre de células de las distintas fracciones obtenidas en la reacción de la restrictocina con SPDP

En las gráficas se representa las curvas de inhibición de síntesis de proteínas de las muestras de restrictocina, restrictocina-PDP y restrictocina-SH, como porcentaje de inhibición con respecto al control de síntesis a las distintas concentraciones ensayadas. Como control positivo de síntesis se consideró el número de cuentas por minuto incorporadas a proteínas en un experimento cuando el experimento se realizó en ausencia de toxina. La obtención de cada una de las muestras así como su definición quedan recogidos en el apartado 2.7.

Tabla 3.2. Inhibición de síntesis de proteínas en sistema libre de células de las distintas fracciones obtenidas en la reacción de la restrictocina con SPDP

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀, en concentración pico molar (Mx10¹²), para las muestras de restrictocina, restrictocina-PDP y restrictocina-SH. Estos valores se obtienen por interpolación en las curvas dosis-respuesta de inhibición de síntesis de proteínas de la figura 3.38. Como porcentaje de actividad se entiende el tanto por ciento de actividad remanente de cada una de las muestras, considerando 100% de actividad la concentración de la restrictocina con la que se alcanza el IC₅₀.

Figura 3.39.

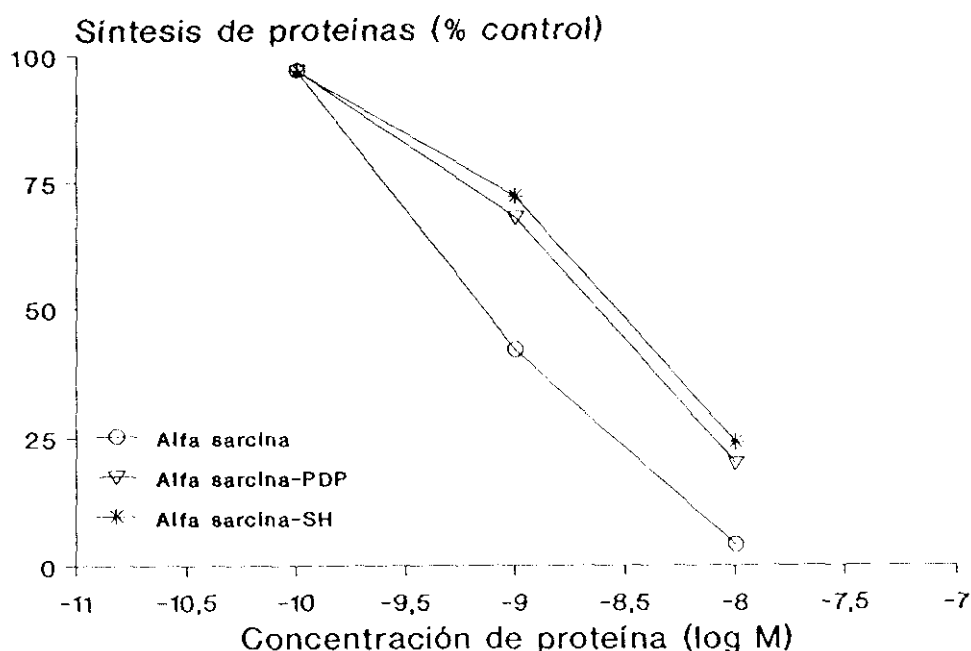


Tabla 3.3.

fracciones	IC ₅₀ (Mx10 ¹²)	actividad (%)
α-sarcina	20.0	100
α-sarcina-PDP	450.0	77.4
α-sarcina-SH	490.0	74.2

Fig. 3.39. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas en sistema libre de células de las distintas fracciones obtenidas en la reacción de la α-sarcina con SPDP

En las gráficas se representa las curvas de inhibición de síntesis de proteínas de las muestras de α-sarcina, α-sarcina-PDP y α-sarcina-SH, como porcentaje de inhibición con respecto al control de síntesis a las distintas concentraciones ensayadas. Como control positivo de síntesis se consideró el número de cuentas por minuto incorporadas a proteínas en un experimento cuando el experimento se realizó en ausencia de toxina. La obtención de cada una de las muestras así como su definición quedan recogidos en el apartado 2.7.

Tabla 3.3. Inhibición de síntesis de proteínas en sistema libre de células de las distintas fracciones obtenidas en la reacción de la α-sarcina con SPDP

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀, en concentración pico molar (Mx10¹²), para las muestras de α-sarcina, α-sarcina-PDP y α-sarcina-SH. Estos valores se obtienen por interpolación en las curvas dosis-respuesta de inhibición de síntesis de proteínas de la figura 3.39. Como porcentaje de actividad se entiende el tanto por ciento de actividad remanente de cada una de las muestras, considerando 100% de actividad la concentración de la α-sarcina con la que se alcanza el IC₅₀.

Esta reacción con agentes como el SPDP (326) o el SMPT (336), puede ir acompañada de una reducción de la actividad de las proteínas o de una alteración de su estructura (333). Para verificar este hecho, se estudió comparativamente la actividad de inhibición de síntesis de proteínas en sistema libre de células de las siguientes muestras: 1) aspergilas nativas, 2) una muestra de la especie molecular obtenida tras la reacción con SPDP, denominada aspergilina-PDP, y 3) una muestra de la aspergilina-PDP tras la reducción con ditioneitol, denominada aspergilina-SH o aspergilina activada. Por otro lado, las tres muestras fueron analizadas en PAGE-SDS, en condiciones reductoras y no reductoras con el fin de comprobar si la movilidad de la proteína había sufrido alguna alteración.

En las figuras 3.38. y 3.39., se recogen las curvas de inhibición de síntesis de proteínas obtenidas para las distintas muestras de restrictocina (fig 3.38.) y de α -sarcina (fig 3.39.). Los valores de IC_{50} obtenidos por interpolación lineal en dichas curvas para cada muestra quedan recogidos en la tabla 3.2. para la restrictocina y en la tabla 3.3. para la α -sarcina, así como el porcentaje de actividad remanente, considerando como 100% de actividad, el valor de IC_{50} de las muestras de aspergilina nativa.

Como puede observarse, la pérdida de actividad de la restrictocina tras la reacción con SPDP (restrictocina-PDP) y su posterior reducción se estima en un 8.9% para la restrictocina-PDP y en un 11.7% para la restrictocina-SH, mientras que para la α -sarcina-PDP fue de un 23.6% y para la α -sarcina-SH de un 25.8%. Las pérdidas de actividad descritas para otras toxinas llegan a ser de hasta un 40% en el caso de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (342) y de un 37% en el caso de la briodina (52), por tanto puede considerarse que las aspergilas, especialmente la restrictocina y en menor grado la α -sarcina, mantienen niveles de actividad muy elevados tras su reacción con los agentes bifuncionales. En cualquier caso, parte de la pérdida de actividad puede ser debida a la utilización de una concentración excesiva de SPDP y un elevado número de grupos PDP introducidos en la molécula (333). Esta variación en la actividad puede ser corregida revisando las concentraciones de toxina y de agente biespecífico utilizadas en la reacción.

El análisis en PAGE-SDS de las fracciones de restrictocina antes y después de la reacción con SPDP, se recoge en la figura 3.40. A. En los pocillos 1 y 2, fueron aplicadas dos cantidades distintas de restrictocina nativa. Como puede observarse en el pocillo 2, la muestra una banda de peso molecular superior a 30.000, que corresponde aproximadamente un 10% de la proteína agregada, según ha sido estimado por densitometría.

En el pocillo 3 se aplicó una muestra de restrictocina-PDP que presentó una movilidad similar a la restrictocina nativa. Por tanto, como puede comprobarse la movilidad de la proteína no se ve afectada con la incorporación de los grupos PDP, a su moléculas. Este resultado fueron corroborados posteriormente en los geles de poliacrilamida en los que se estudiaron las fracciones obtenidas de la conjugación y purificación de las inmunotoxinas (ver figuras 3.62. a 3.65.).

Por otro lado, las muestras de restrictocina-SH no presentan

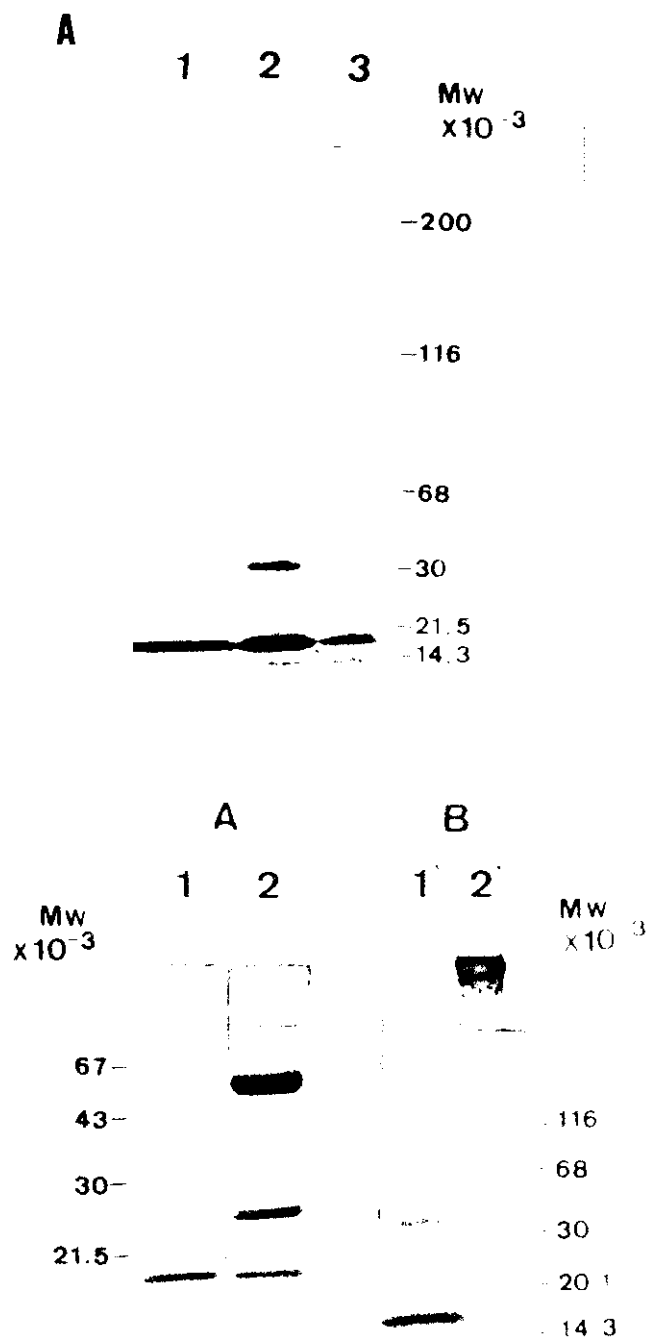


Fig. 3.40. Análisis en PAGE-SDS de las fracciones obtenidas tras la reacción de la restrictocina con SPDP y tras la reducción de los grupos PDP incorporados a la toxina

A) La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida en gradiente de entre un 5% p/v y un 15% p/v de acrilamida (apartado 2.3.7.1.). Las muestras aplicadas fueron las siguientes: pocillos 1 y 2). 5 μ g y 10 μ g respectivamente, de restrictocina, pocillo 3). 3 μ g de restrictocina-PDP, o restrictocina unida a los grupos PDP (apartado 2.7.1.).

B) La electroforesis se llevó a cabo en un gel en gradiente de entre 10% p/v y 15% p/v de acrilamida con SDS y en condiciones reductoras (A, pocillos 1 y 2) y no reductoras (B, pocillos 1' y 2'). Las muestras aplicadas fueron las siguientes: pocillos 1 y 1'). 2.5 μ g de restrictocina-SH o restrictocina reducida con ditioneitol tras la reacción con SPDP (apartado 2.7.2.) y pocillos 2 y 2'). 10 μ g del material de la mezcla de conjugación entre el anticuerpo MBr 1 y la restrictocina, antes de la filtración en Ultragel Aca 44 (apartado 2.7.5.1.).

En ambos geles se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

modificaciones en su peso molecular, según se recogen en la figura 3.40. B. En este caso, si la electroforesis se realiza en condiciones no reductoras (pocillos 1' y 2'), puede observarse en determinadas ocasiones la aparición de agregados característicos de 2 o mas moléculas de proteína. Esta agregación de restrictocina-SH, puede ser debida a la alta reactividad que presentan los grupos SH libres y que inducen a la formación de homoagregados que desaparecen con la adición de agentes reductores. Un fenómeno similar puede observarse en las moléculas de anticuerpo monoclonal tras la reacción con los agentes bifuncionales, como será referido posteriormente (271,333).

En los pocillos denominados 2 y 2' de la misma figura, se aplicaron las muestras de la mezcla de conjugación de MBr 1 con restrictocina, antes de la purificación de los conjugados. La característica más destacable de la comparación entre los dos geles, realizados en condiciones reductoras y no reductoras es la intensidad de la banda correspondiente a la restrictocina-SH. En el pocillo 2', en condiciones no reductoras, la banda de toxina corresponde con la fracción de proteína que no se ha unido al anticuerpo monoclonal MBr 1, mientras que en el pocillo 2, en condiciones reductoras, la banda de proteína se corresponde con la proteína total.

Puede observarse, así mismo, como mientras que el conjugado MBr 1-restrictocina no es capaz de entrar en el gel separador debido a su elevado peso molecular (pocillo 2'), cuando es sometido a reducción aparecen tres bandas en el gel que se corresponden con las cadenas pesadas (aproximadamente 50.000 de peso molecular y ligeras (aproximadamente 25.000 de peso molecular) de las moléculas de inmunoglobulina que componen la molécula de IgM y la banda de la restrictocina (aproximadamente 17.000 de peso molecular).

3.3.2. Actividad citotóxica de las toxinas en distintas líneas celulares en cultivo

La actividad citotóxica de las toxinas, de sus derivados y de las inmunotoxinas ha sido estudiada en líneas celulares tumorales de origen humano en cultivo. Para ello se pusieron a punto dos métodos distintos: 1) valoración de la inhibición de la síntesis de proteínas tras la incubación de las líneas celulares en cultivo, determinada como porcentaje de incorporación de prolina tritiada ($L-(^3H)-Pro$) a las células (ver apartado 2.10.2.3.1.) y 2) valoración de la inhibición de la proliferación de las células incubadas durante distintos periodos de tiempo con las toxinas (ver apartado 2.10.2.3.2.).

Ambos métodos permitieron evaluar el efecto de las toxinas a partir del crecimiento de las células que no se ven afectadas durante el tratamiento. En el primer método, la incorporación de leucina tritiada está en función del número de células que permanecen metabólicamente activas y que son capaces de sintetizar proteínas *de novo* en periodos de tiempo cortos, mientras que en el segundo método se determina la capacidad de proliferación de las células supervivientes.

En la evaluación de los resultados obtenidos con el primer

método o valoración de la inhibición de síntesis de proteínas, la posibilidad de un bloqueo metabólico temporal y reversible, que afecta a la síntesis de proteínas sin llegar a causar la muerte celular o las posibles modificaciones de la adherencia de la célula a la placa, pueden interferir en los resultados y dificultar su interpretación. Por este motivo, los experimentos realizados por el segundo método o de inhibición de la proliferación celular, en los que se valoró la actividad de la toxina a tiempos largos, podrían ser considerados como un método más idóneo para evaluar la actividad de las toxinas y de sus conjugados, ya que los efectos secundarios derivados de su aplicación tienen una incidencia menor (370).

3.3.2.1. Características de las líneas celulares

La actividad citotóxica de las proteínas ha sido estudiada en líneas celulares tumorales en cultivo, así como sobre líneas celulares normales utilizadas como control. En casi todos los experimentos se han utilizado líneas celulares derivadas de carcinomas y de melanomas humanos que crecen adheridas al fondo del recipiente de cultivo.

El resultado de los experimentos depende, en gran parte, del estado de las monocapas y por ello es importante escoger las condiciones óptimas de cultivo, para realizar cualquier tipo de estudios. Uno de los problemas más importantes al trabajar con moléculas como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las líneas tumorales, que basan su capacidad de interacción con la superficie celular en la afinidad por las moléculas de membrana contra los que han sido sintetizados, es comprobar que no existe contaminación por micoplasma en las líneas celulares, ya que esta contaminación varía cuantitativa y cualitativamente las moléculas que aparecen en la membrana celular; por esta razón, las líneas celulares han de ser periódicamente analizadas al microscopio electrónico para comprobar que están libres de micoplasma, que pudiera interferir en los resultados obtenidos.

Las líneas celulares utilizadas han sido los siguientes carcinomas humanos de origen epidérmico: el carcinoma mamario MCF 7, el carcinoma de colon HT-29, los carcinomas ováricos SW626 y OvCa 432, el carcinoma epidermoide vulvar A431 y los melanomas MeWo, HT-144 y MALME-3M. Algunas de las características morfológicas y de cultivo quedan recogidas en los apartados 2.1.3. y 2.9. y en la tabla 2.2.

Para todas ellas, se ha dispuesto de uno o más anticuerpos monoclonales que presentan reactividad con antígenos expresados en la membrana de las células. La denominación de dichos anticuerpos, así como la línea celular que reconocen y sus características más importantes quedan reflejadas en la tabla 2.3. a 2.5.

3.3.2.2. Inhibición de síntesis de proteínas

3.3.2.2.1. Citotoxicidad de las aspergilinas

Los resultados obtenidos en la inhibición de síntesis de proteínas en las distintas líneas celulares en cultivo se recogen

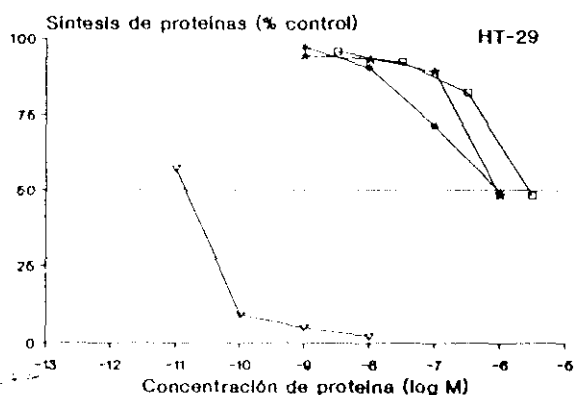
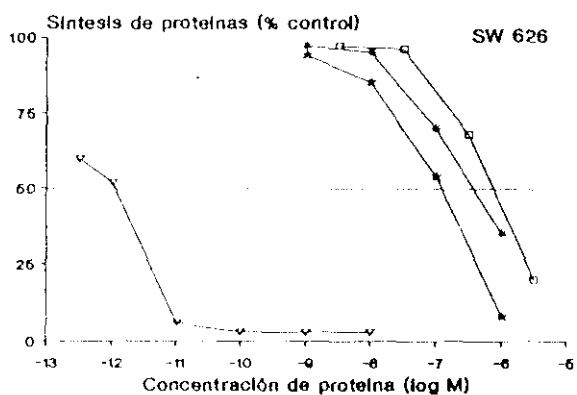
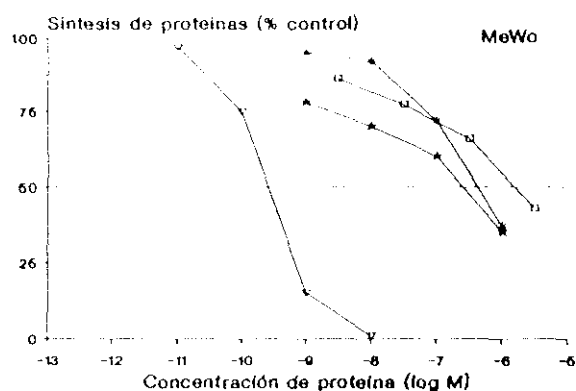
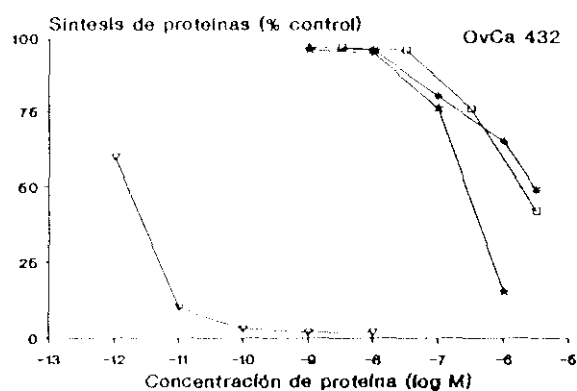


Fig. 3.41. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas en líneas celulares en cultivo

En la figura se representan las curvas de inhibición de síntesis de proteínas obtenidas en OvCa 432, MeWo, SW 626 y HT-29, para la ricina (▽), la α-sarcosina (★), la mitogillina (✱) y la briodina (□), según el método de incorporación de leucina tritiada a los cultivos celulares, tras el tratamiento con distintas concentraciones de toxinas. Las concentraciones utilizadas se representan en base logarítmica, como log M. Como control de síntesis de proteínas se considera el número de cuentas por minuto incorporadas a un número de células equivalentes. El método experimental se describe en el apartado 2.10.2.3.1.

Fig. 3.42. Inhibición de síntesis de proteínas en líneas celulares en cultivo

A) Curvas de inhibición de síntesis de proteínas en la línea celular MCF 7, para las toxinas ricina (▽), d-sarcina (★), mitogillina (✕) y briodina (□).

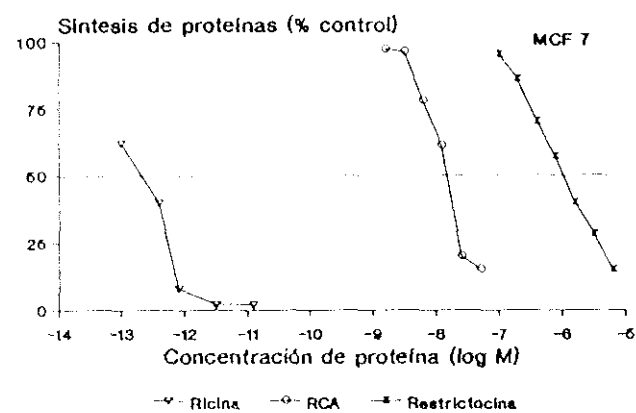
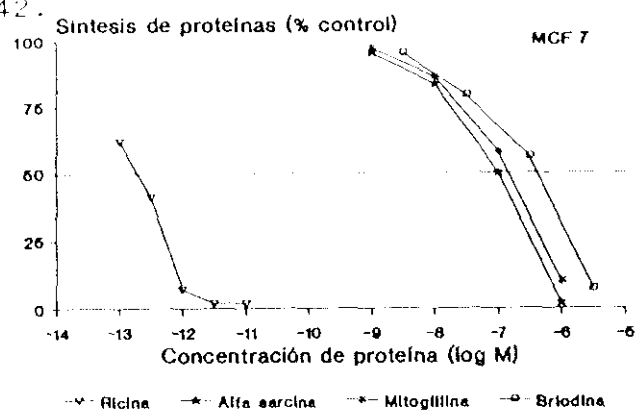
B) Curvas de inhibición de síntesis de proteínas en la línea celular MCF 7, obtenidas para las toxinas ricina (▽), RCA (○) y restrictocina (⊗).

En ambas gráficas se representan los porcentajes de inhibición de síntesis de proteínas para las distintas concentraciones de toxinas utilizadas, valorados como incorporación de leucina tritiada al cultivo. Como valor 100% de síntesis de proteínas se consideró el total de cuentas incorporadas por un número de células equivalentes, no sometidas a la acción de las toxinas. La concentración de toxina utilizada se refiere como log M.

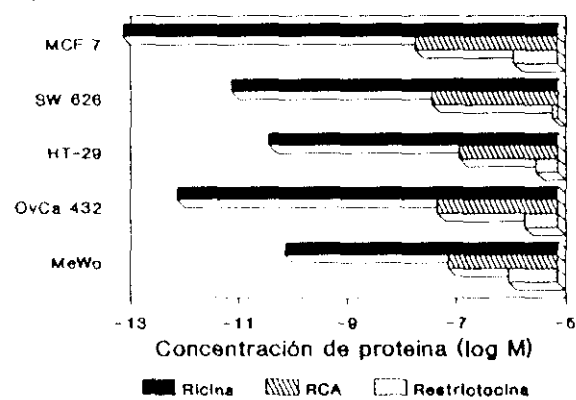
C) En la figura se representa, a modo de barras, el valor de IC₅₀, como concentración molar de proteínas, obtenido para la ricina, RCA y restrictocina sobre las líneas celulares especificadas. Estos valores han sido obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta de cada una de las toxinas sobre cada una de las líneas celulares.

El procedimiento experimental utilizado, se recoge en el apartado 2.10.2.3.1.

Figura 3.42.



Líneas celulares



en las tablas 3.4. y 3.5. Estos resultados se expresan como valores de IC_{50} , en concentración molar, que representa la concentración de proteína capaz de inhibir la síntesis de proteínas en un 50%, considerando el 100% de síntesis de proteínas el número de cuentas por minuto de prolina marcada, que incorporan las células no incubadas con las muestra de proteína.

Los valores de IC_{50} han sido obtenidos por interpolación en las curvas de inhibición de síntesis de proteínas, recogidas en las figuras 3.41. y 3.42. A y B, en las que se representa el porcentaje de inhibición obtenido para las distintas concentraciones ensayadas.

Así, según puede observarse en la tabla 3.4., los valores de IC_{50} obtenidos para la α -sarcina presentó valores de IC_{50} comprendidos entre 3.1×10^{-6} M en HT-29 y 0.1×10^{-6} M en SW626, para la mitogillina oscilan entre 5.8×10^{-6} M en HT-29 y 0.045×10^{-6} M para A431, mientras que los valores obtenidos para la restrictocina se sitúan entre 6.5×10^{-6} M para SW626 y 0.9×10^{-6} M en MeWo, en los primeros experimentos. Como puede observarse, todos los valores, excepto el obtenido para la mitogillina sobre A 431, oscilan dentro de un orden de magnitud de concentración molar, entre 10^{-6} M y 10^{-7} M.

3.3.2.2.2. Citotoxicidad de las toxinas de origen vegetal en las distintas líneas celulares

Los valores de citotoxicidad obtenidos para la demás toxinas quedan recogidos en la tabla 3.5.

La toxina que se presentó mas activa sobre las líneas celulares en cultivo fue la ricina, para la que se obtuvieron valores de IC_{50} entre 0.29×10^{-12} M en MCF 7, la línea más sensible a la acción de la toxina y 87×10^{-12} M en MeWo, como línea más resistente. La ricina resultó entre 1.500.000 y 38.000 veces mas activa sobre las líneas celulares que la briodina y la PAP, entre 4.500.000 y 3.000 que las aspergilinas y entre 17.000 y 4.000 veces más activa que su cadena A.

Los valores obtenidos para la cadena A de la ricina, se encuentran entre un IC_{50} de 0.044×10^{-6} M en la línea celular MCF 7 y de 0.34×10^{-6} M en MeWo. Esta resultó entre 3 y 60 veces más activa que las demás toxinas compuesta por una sola cadena polipeptídica, carentes de sitio lectínico, con excepción de la mitogillina sobre A 431, sobre la que ambas toxinas presentan una toxicidad similar.

Aunque de estos resultados puede deducirse que la cadena A de la ricina es más activa que las toxinas de una sola cadena, hay que tener en cuenta que la purificación de esta cadena a partir de la molécula completa de ricina presenta, desde el punto de vista técnico, una gran dificultad (21), por lo que esta mayor citotoxicidad puede ser debida a contaminación de la cadena A con cadena B o a una la presencia en la muestra de una pequeña proporción de moléculas no reducidas.

Tabla 3.4.

línea celular	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)		
	α-sarcina	mitogillina	restrictocina
MCF 7	1.30	1.20	1.30
HT-29	3.10	5.80	5.00
SW 626	0.11	1.10	6.50
OvCa 432	0.30	3.30	3.60
MeWo	0.24	1.60	0.90
A 431	1.50	0.045	—

Tabla 3.5.

línea celular	IC ₅₀ (Mx10 ¹²)	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)		
	ricina	RCA	briodina	PAP
MCF 7	0.29	0.044	0.37	1.10
HT-29	20.00	0.13	4.90	—
SW 626	5.50	0.055	1.40	—
OvCa 432	0.65	0.065	2.80	0.60
MeWo	87.00	0.340	3.30	—
A 431	17.00	0.070	—	0.26

tablas 3.4. y 3.5. Valoración de la actividad citotóxica de las toxinas, determinada como inhibición de la síntesis de proteínas, sobre las distintas líneas celulares tumorales humanas en cultivo. En las tablas se recogen los valores de IC₅₀, o concentración de proteína capaz de inhibir hasta un 50% la síntesis de proteínas, obtenidos para cada una de las toxinas utilizadas en esta tesis sobre las distintas líneas celulares (apartado 2.10.2.3.1.). Estos valores han sido obtenidos por interpolación en las curvas dosis respuesta de inhibición de síntesis (ver figuras 3.41. y 3.42.).

En la tabla 3.4. aparecen los resultados obtenidos para las aspergillinas, expresados en concentración micromolar (Mx10⁻⁶). En la tabla 3.5. se recogen los valores de IC₅₀ obtenidos para el resto de las toxinas, expresados en concentración picomolar (Mx10⁻¹²) en el caso de la ricina y en concentración micromolar (Mx10⁻⁶) para las demás toxinas compuestas por una sola cadena polipeptídica. En ambas tablas, la ausencia de valor en la posición correspondiente (—) significa que la proteína no ha sido ensayada sobre la línea celular en cuestión.

Los valores de IC₅₀ obtenidos para la briodina, oscilaron entre 0.37×10^{-6} M en MCF 7 y 4.9×10^{-6} M en OvCa 432, esta toxina no ha sido ensayada sobre A 431. Por último, la PAP, que ha sido testada en tres de las líneas celulares, resultó ligeramente más toxica que la briodina en MeWo. Ambas toxinas presentan niveles de citotoxicidad similares a los obtenidos para las aspergilinas.

Cuando se comparan los resultados obtenidos sobre lisado de reticulocitos de conejo (ver tabla 3.1.) con los obtenidos en células completas (ver tablas 3.4. y 3.5.), puede observarse que las toxinas de una sola cadena son entre 100 y 10.000 veces menos activas sobre células. Estos resultados confirman la teoría de que la toxicidad de las proteínas compuestas por una sola cadena, está en función de su capacidad para entrar en las células (232) y de la existencia en su molécula de una cadena B que interacciona con la superficie celular y facilita su translocación al interior del citoplasma (26).

La única toxina que mantiene niveles de toxicidad similares en ambos experimentos es la ricina, compuesta por dos cadenas polipeptídica y que presenta receptores en la superficie celular reconocidos por su cadena B (141,142). Las curvas de citotoxicidad, quedan recogidas en las figuras 3.41. y 3.42., en donde se representa el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas en las distintas líneas celulares en función de la concentración de proteína utilizada.

Cuando se estudian comparativamente los valores de IC₅₀ obtenidos para la ricina y para su cadena A sobre las líneas celulares (figura 3.42. C), puede observarse que existe un cierto grado de correlación entre la sensibilidad mostrada por las células a la acción de ambas toxinas. Líneas como MCF 7 y OvCa 432, sobre las que la ricina presenta un alto nivel de citotoxicidad, son las células más sensibles a la acción de su cadena A.

Ha sido descrito el mecanismo de entrada de la ricina en las líneas celulares, pero no el de la cadena A (150). Según estos resultados, es posible que esta cadena, que es capaz de reconocer residuos de hidratos de carbono presentes en la superficie celular, tenga un papel destacado en la internalización de la toxina colaborando con la cadena B en la inducción de los mecanismos de endocitosis (150). Las diferencias de toxicidad observadas en las líneas celulares estarían en función del número de receptores expresados en la superficie celular.

3.3.2.3. Inhibición de la proliferación celular

En las tablas 3.6. y 3.7. se recogen los valores de citotoxicidad obtenidos para la α -sarcina y la cadena A de la ricina, respectivamente, sobre 4 líneas celulares. En ambos casos, aparecen reflejados, junto con los resultados de inhibición de síntesis de proteínas, los resultados obtenidos en experimentos de inhibición de la proliferación celular (ver apartado 2.10.2.3.2.).

Cuando se evalúa la actividad de la α -sarcina por este segundo procedimiento, la proteína se muestra entre 48 y 5000

Tabla 3.6.

línea celular	inhibición de:		incremento actividad
	síntesis proteínas	proliferación	
	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	
MCF 7	3.20	0.013	246
OVCA 432	0.34	0.007	48
MeWo	3.20	0.0036	889
A 431	1.50	0.0003	5000

Tabla 3.7.

línea celular	inhibición de:		incremento actividad
	síntesis proteínas	proliferación	
	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	
MCF 7	0.044	0.013	3.4
OVCA 432	0.065	0.015	4.3
MeWo	0.35	0.030	11.6

Tablas 3.6. y 3.7. Comparación de los valores de citotoxicidad de la α -sarcina y de la cadena A de la ricina (RCA) sobre las líneas celulares en cultivo por los métodos de inhibición de síntesis de proteínas y de inhibición de la proliferación celular.

En las tablas se recogen los valores de IC₅₀ obtenidos para la α -sarcina (tabla 3.6.) y para la cadena A de la ricina (tabla 3.7.) en distintas líneas celulares por el método de valoración de la inhibición de la síntesis de proteínas (primera columna) y por el método de inhibición de la proliferación celular (segunda columna), descritos en el apartado 2.10.2.3. En ambos casos, los resultados se expresan en concentración micromolar (Mx10⁶). Así mismo, se especifica el aumento relativo de la actividad de ambas proteínas sobre cada una de las líneas celulares, que representa el cociente entre el valor de IC₅₀ obtenido en estudios de proliferación celular y el valor obtenido en inhibición de síntesis de proteínas (tercera columna). En el caso de la cadena A de la ricina no ha sido ensayada sobre la línea celular A 431.

veces mas tóxica sobre las células. Así en la línea A 431, se obtiene un valor de IC_{50} igual a 3.0×10^{-10} M frente a 1.5×10^{-6} M en inhibición de síntesis de proteínas. Estos resultados hacen suponer que la sensibilidad de las líneas celulares a la acción de la toxina es mayor cuando aumenta el tiempo de exposición a su acción.

La cadena A de la ricina no presentó igual comportamiento (ver tabla 3.7.), así su actividad se ve incrementada solo ligeramente, resultando 10 veces más activa en Mewo, 4 veces en OvCa 432 y 3 veces en MCF 7. Por primera vez, la α -sarcina presenta una mayor actividad que la RCA sobre 2 de las 3 líneas celulares estudiadas, cuando su efecto es controlado a largo plazo.

3.3.2.4. Influencia del tiempo de exposición de las células a la toxina sobre los valores de citotoxicidad

En un intento de comprobar esta hipótesis, se incubaron células de las líneas OvCa 432 y MCF 7 con la α -sarcina durante distintos tiempos: 20 min, 3 horas, 20 horas y 6 días. Finalizado cada uno de los tiempos de incubación seleccionados, la toxina era eliminada y el cultivo se continuaba hasta los 6 días, cuando se comprobaba el número de células presentes en los pocillos.

Los resultados obtenidos quedan recogidos en la figura 3.43. y los valores de IC_{50} calculados para cada uno de los tiempos de incubación, en la tabla 3.8. Como puede observarse, estos valores de IC_{50} fueron, en todos los casos inferiores a los obtenidos por el método de valoración de inhibición de síntesis de proteínas, aún cuando en dos de los experimentos, el tiempo de incubación era significativamente inferior (20 minutos y 3 horas frente a 20 horas de incubación).

En ambas líneas celulares, los mayores niveles de citotoxicidad se obtuvieron cuando la toxina se mantuvo durante los 6 días que duró el experimento. En MCF 7, se observa un aumento progresivo de la toxicidad conforme el tiempo de exposición de las células a la α -sarcina es mayor.

Aunque sí parece ser cierto que los tratamientos a largo plazo potencian la actividad de la α -sarcina, estos experimentos no permiten aclarar las diferencias observadas entre ambos métodos de determinación de la citotoxicidad. Una de las causas que podrían explicar estas diferencias podría ser el tiempo medio de proliferación celular (estimado en 30.3 horas para MCF 7 y en 48.0 para OvCa 432), pero la α -sarcina no se muestra significativamente más activa en células que se dividen rápidamente.

3.3.2.5. Variación de la citotoxicidad de las aspergilinas tras la reacción con SPDP

Como ha sido referido en el capítulo dedicado al estudio de la inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de células (ver apartado 3.3.1.2.), es necesario valorar la pérdida de actividad de las toxinas observada tras la reacción con agentes bifuncionales. Por tanto, la actividad citotóxica de las

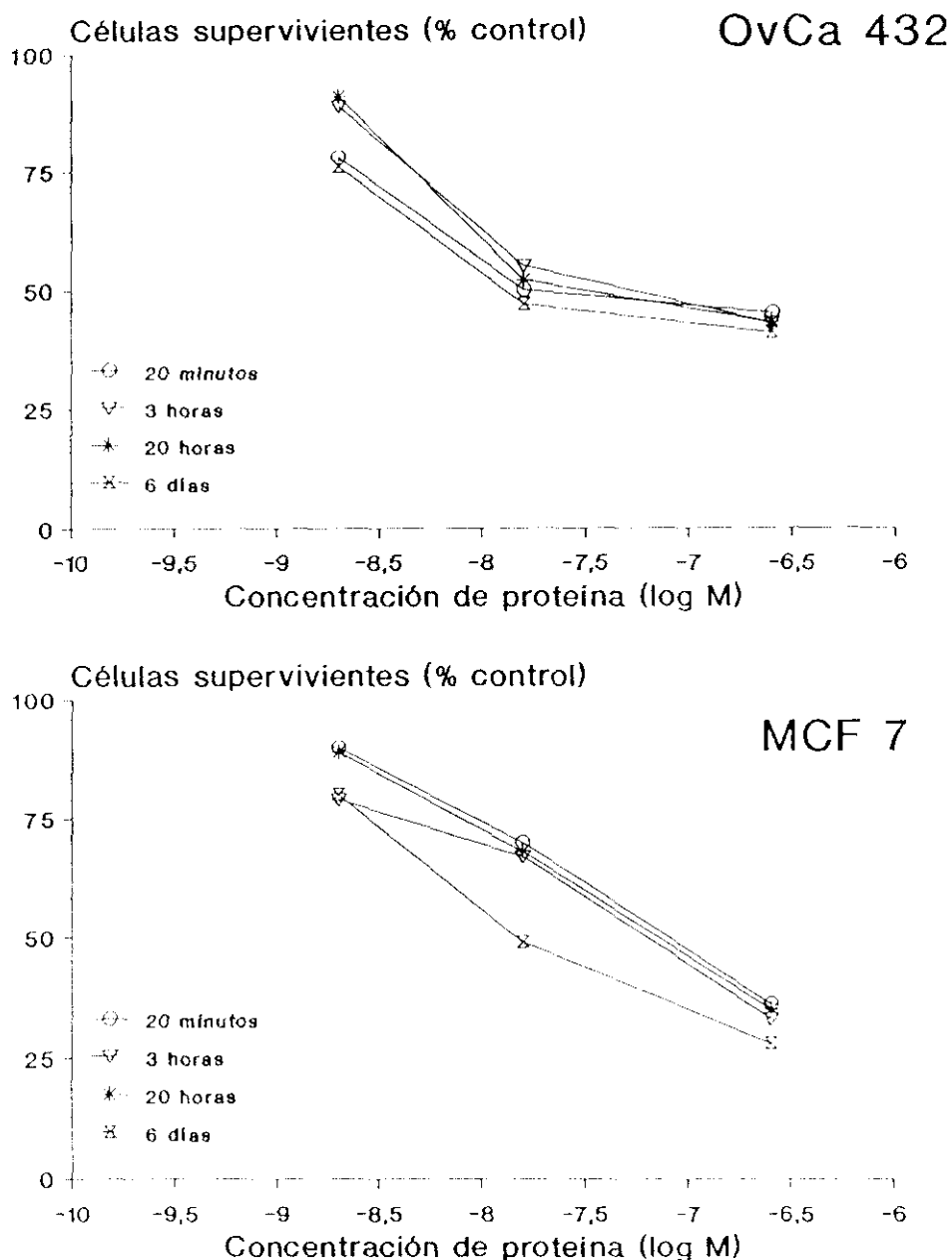


Fig. 3.43. Curvas de inhibición de la proliferación de células de las líneas OvCa 432 y MCF 7 tratadas con α -sarcina a distintos tiempos

En la figura se recogen los porcentajes de células supervivientes obtenidos cuando células de las líneas OvCa 432 y MCF 7, son tratadas con distintas concentraciones de α -sarcina, a distintos tiempos. Los tiempos de exposición a la toxina quedan reflejados en la gráfica y las concentraciones de proteínas se expresan como el log de la concentración molar. Como valor 100% de células supervivientes se considera el número de células presentes en los pocillos, al 6º día de cultivo, cuando las células no son expuestas a la acción de la toxina. El procedimiento experimental se describe detalladamente en el apartado 2.10.2.3.2.

Tabla 3.8.

tiempo de tratamiento	línea celular	
	OvCa 432	MCF 7
	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)
20 minutos	0.016	0.090
3 horas	0.032	0.065
20 horas	0.060	0.080
6 días	0.010	0.013

Tabla 3.8. Inhibición de la proliferación celular en células de las líneas OvCa 432 y MCF 7, incubadas con α -sarcina durante distintos tiempos

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀, en concentración micromolar (Mx10⁶) obtenidos para la α -sarcina cuando las células son incubadas durante distintos tiempos con α -sarcina. Estos valores han sido obtenidos por interpolación en las curvas de inhibición de la proliferación celular, que se recogen en la figura 3.43.. El procedimiento experimental se describe detalladamente en el apartado 2.10.2.3.2..

fracciones de aspergilina, aspergilina-PDP y aspergilina-SH, fue valorada comparativamente sobre las distintas líneas celulares.

Los valores de IC_{50} obtenidos para las muestras de aspergilina y aspergilina-PDP sobre distintas líneas celulares, quedan recogidas en la tabla 3.9., en donde también se incluye el porcentaje de actividad remanente con respecto a la proteína nativa. Como puede observarse, ambas muestras presentan valores muy similares de actividad con diferencias que, en la mayoría de los casos, se encuentran dentro del error estándar del método utilizado.

Sólo se observa una disminución significativa en la línea celular MCF 7, en la que el valor de IC_{50} varía de 1.3×10^{-6} M para la restrictocina a 10×10^{-6} M para la restrictocina-PDP, lo que representa una pérdida de actividad estimada en un 15%.

Las muestras de α -sarcina presentaron un comportamiento similar, cuyos valores de IC_{50} obtenidos por el método de inhibición de la proliferación celular, también quedan recogidos en la tabla 3.9. Las pérdidas de actividad de la α -sarcina-PDP, con respecto a la molécula de α -sarcina nativa, fueron de aproximadamente un 10% en las líneas celulares MeWo y A 431.

No han sido incluidos los valores de IC_{50} obtenidos en las muestras de aspergilina-SH, ya que cuando fue ensayada su actividad sobre las células, se observó que esta fracción recuperaba parte de la actividad citotóxica perdida, situándose sus valores de IC_{50} entre los obtenidos para las muestras de aspergilina y aspergilina-PDP.

Como ejemplo de estos resultados, en la figura 3.44. se recogen las curvas de inhibición de la síntesis de proteínas obtenidas para las fracciones de restrictocina sobre células de la línea MCF 7. Este resultado puede ser explicado en base a la alta reactividad que presentan los grupos sulfhidrilo libre de la molécula de aspergilina-PDP, que interaccionan de forma no específicas con la superficie celular contribuyendo al descenso de la actividad de la molécula (333). La reducción de estos grupos, permite recuperar parte de la actividad perdida.

3.4. Interacción de las toxinas con colorantes triazínicos inmovilizados

La capacidad de gran número de proteínas para interaccionar con los colorantes triazínicos es conocida desde hace varias décadas (433). Entre estas proteínas se encuentran las quinasas, las deshidrogenasas o las enzimas dependientes de nucleótidos (433); estas últimas reconocen a los colorantes triazínicos como análogos de sustrato ya que su estructura se asemeja a la de los nucleótidos que forman parte de los ácidos nucleicos y de gran número de cofactores enzimáticos (377).

También ha sido descrita por distintos autores la capacidad de interacción de proteínas tóxicas como la toxina difterica (377), la ricina (354), la gelonina (359,378), la momordina (359) o la α -sarcina (378) con moléculas de Cibacron Blue F3GA. De esta

Tabla 3.9. Valores de citotoxicidad sobre distintas especies celulares de las fracciones aspergilina y aspergilina-PDP

En la tabla se recogen los valores de IC_{50} expresados en concentración micromolar ($M \times 10^6$) y obtenidos para las muestras de aspergilina y aspergilina-PDP, sobre distintas líneas celulares. Los datos de restrictocina han sido obtenidos por el método de inhibición de la síntesis de proteínas, mientras que los datos de α -sarcina han sido obtenidos por el método de inhibición de la proliferación celular. En la tabla también se recoge el porcentaje de actividad remanente de las muestras aspergilina-PDP, con respecto a las muestras de aspergilina nativa. El proceso experimental de obtención de las muestras y de desarrollo del experimento, se recoge en los apartados 2.7. y 2.10.2.3.1.

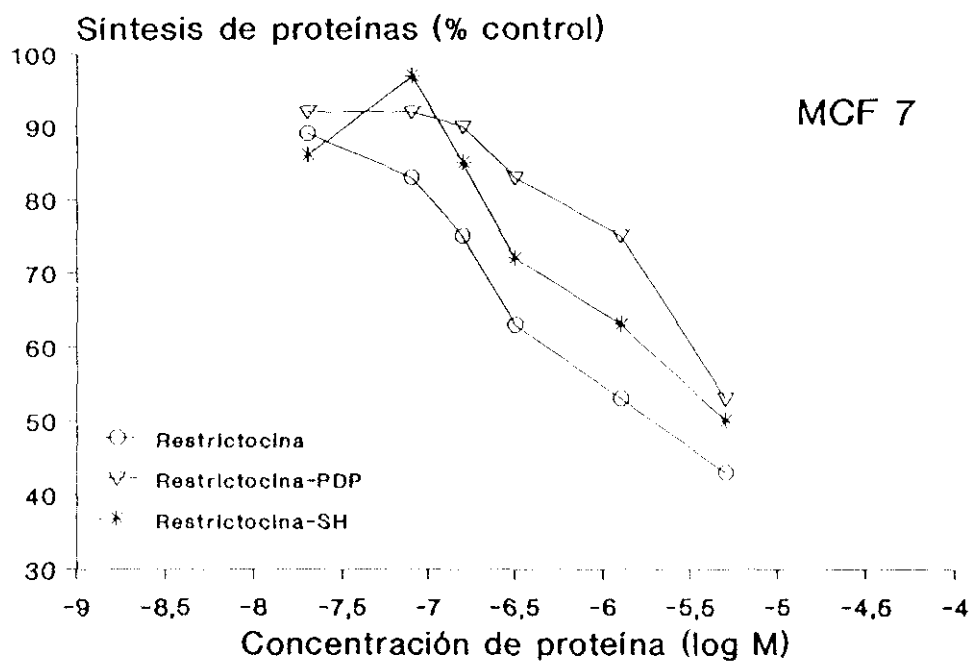
Fig. 3.44. Curvas de inhibición de la síntesis de proteínas de la restrictocina y sus productos de reacción con SPOP en células de la línea MCF 7

En la gráfica se recogen las curvas de inhibición de la síntesis de proteínas de las muestras de restrictocina, restrictocina-PDP y restrictocina-SH. Para cada una de las concentraciones ensayadas, se representa el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas obtenido, con respecto al control. Como valor 100% ó control se considera el número de cuentas por minuto incorporadas por un cultivo de células de MCF 7, no tratadas con ninguna de las muestras. El procedimiento experimental se recoge en el apartado 2.10.2.3.1.

Tabla 3.9.

línea celular	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)		actividad (%)
	aspergilina	aspergilina-PDP	
restrictocina			
MCF 7	1.3	10.0	85
HT-29	5.0	6.0	96
SW 626	6.5	6.0	102
HT-144	1.1	1.6	95
Malme-3M	0.02	0.02	100
α-sarcina			
MeWo	0.0032	0.011	90
A 431	0.0035	0.013	91

Figura 3.44.



forma, este colorante, unido a distintas matrices, ha sido utilizado en la purificación de inmunotoxinas realizadas con la cadena A de la ricina (254), con la gelonina o con la momordina (359).

Con la intención de utilizar este tipo de resinas en la purificación de las inmunotoxinas realizadas con las aspergillinas, se llevaron a cabo distintos experimentos en los que se estudió la capacidad de interacción de la α -sarcina y de la mitogillina con dos colorantes triazínicos: Cibacron Blue F3GA y Procion Red.

3.4.1. Interacción de la α -sarcina con colorantes triazínicos inmovilizados en distintas condiciones experimentales

En una primera serie de experimentos se estudió la interacción de la α -sarcina con Blue-Sepharose. Esta resina se sintetizó a partir de Cibacron Blue F3GA, que fue unido covalentemente a Sepharose CL-4B, según se describe en el apartado 2.4.3.

Para llevar a cabo este estudio, la Blue Sepharose fue distribuida en columnas, que se equilibraron en distintas condiciones de pH y fuerza iónica. En cada una de ellas, se cargó una muestra equivalente de proteína (6 mg totales).

El material retenido en las columnas, se eluyó con alta fuerza iónica. En todos los casos, se determinó la cantidad de proteína presente en la fracción unida a la resina y en la fracción no unida, que fueron expresados como porcentaje del total de la muestra cargado (ver apartado 2.4.4.). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.10.

Como puede observarse (condiciones experimentales B), el porcentaje de proteína unido a la columna fue distinto dependiendo del valor de pH a que se realizó la cromatografía. Así, entre valores de pH 2 y pH 5, la α -sarcina interacciona en un 100% con el Cibacron Blue; entre valores de pH 6 y 9, el porcentaje de retención osciló entre un 87% y un 83% mientras que a pH 10 sólo interacciona un 60.8% del total de la proteína cargada en la columna. Algunos de los perfiles cromatográficos obtenidos, quedan recogidos en las figuras 3.45. y 3.46.

Resultados similares se obtuvieron cuando la α -sarcina se cargó en una columna de Red-Sepharose, sintetizada a partir de Procion Red HE 3B y Sepharose CL-4B activada. Cuando la resina fue equilibrada en tampón 0.04 M Tris-HCl, pH 9, la fracción de proteína unida a la columna fue de un 80%.

Posteriormente se realizaron dos experimentos distintos en los que, variando el tampón de equilibrado, se mantuvo el valor de pH a 7.4. En primer lugar, la columna se equilibró en tampón 0.010 M Tris HCl, pH 7.4, 0.020 M NaCl (condiciones experimentales A), según describen Sperti y col (378), y el porcentaje de α -sarcina retenida en la columna fue de un 97.8%. En segundo lugar, (condiciones experimentales C), cuando la columna se equilibró en tampón 0.1 M fosfato sódico pH 7.4, los porcentajes de proteína unida y no unida a la columna resultaron idénticos

Tabla 3.10.

características del tampón			fracciones	
pH	material y molaridad (mM)	conductividad (mS/cm)	no unida (%)	unida (%)
Condiciones experimentales A:				
7.4	Tris HCl 10 NaCl 20	2.68	2.2	97.8
Condiciones experimentales B:				
2-3	Citrato 50	1.75	0	100
4	Citrato 25	1.93	0	100
5	Acetato 25	1.61	0	100
6	Acetato 25	2.09	13	87
7	Fosfato sódico 25	2.20	16	84
8	Fosfato sódico 10	1.85	17	83
9	Tris HCl 20	0.24	13	87
10	Tris HCl 200	0.37	39.2	60.8
Condiciones experimentales C:				
7.4	Fosfato sódico 100	10.30	48	52

Tabla 3.10. Fraccionamiento de la α -sarcina en Blue Sepharose, bajo diferentes condiciones experimentales

En la tabla se recoge el porcentaje correspondiente a las fracciones unida y no unida a la resina, de cada una de las cromatografías realizadas. En todos los casos, se cargaron muestras de 2 ml de α -sarcina, a razón de 3 mg/ml, en una columna de 1.5 cm x 4.6 cm de Blue Sepharose, equilibrada en el tampón correspondiente. Las columnas fueron eluidas con una concentración de 1 M a 2 M de NaCl en el tampón de equilibrado tal y como se describe en el apartado 2.4.4. En todos los casos se señalan los valores de pH y fuerza iónica, en mS/cm y la composición del tampón utilizado. El rendimiento de recuperación de la proteína estuvo entre un 70% y un 95% del material cargado.

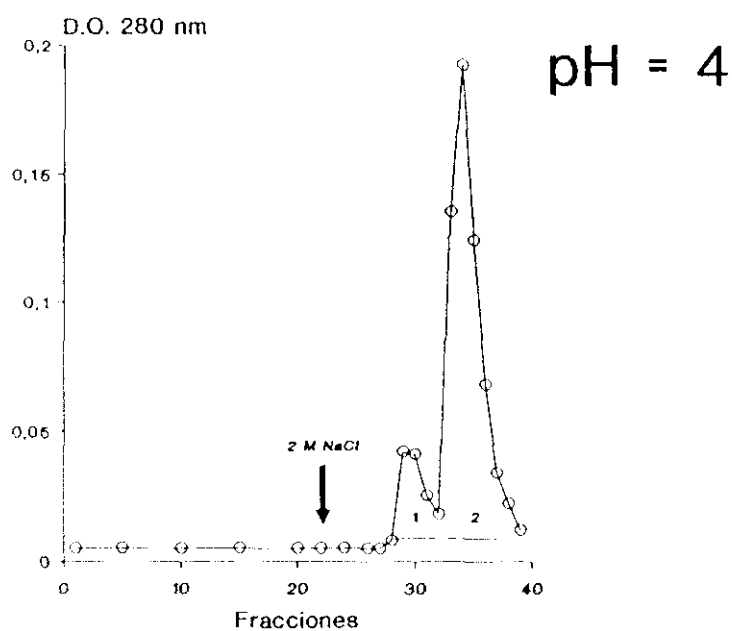
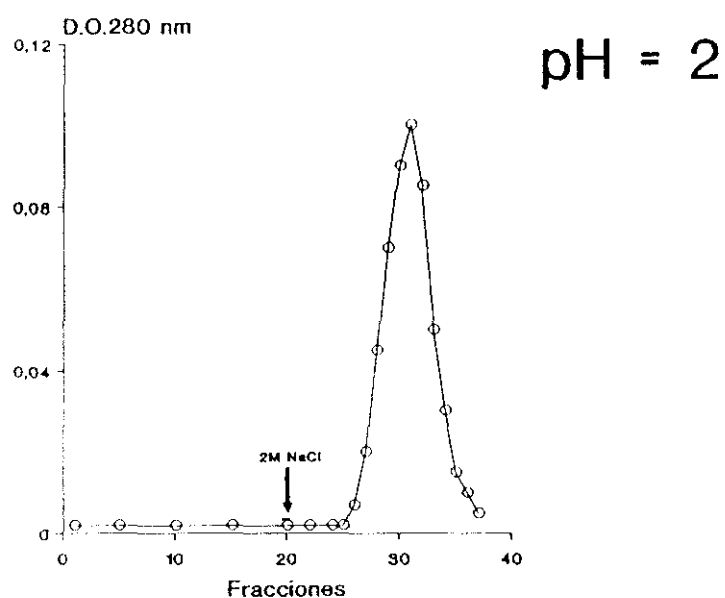


Fig. 3.45. Fraccionamiento de la α -sarcina en Blue Sepharose, equilibrada a distintos valores de pH.

En la figura se recogen los perfiles cromatográficos correspondientes a los experimentos de interacción de la α -sarcina con Cibacron Blue F3GA en los que la resina fue equilibrada a valores de pH 2 y pH 4. Las condiciones experimentales en las que se llevaron a cabo las cromatografías se recogen en la tabla 3.10. Las columnas se eluyeron con 2 M NaCl, en el tampón de equilibrio (↓). Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó la absorción a 280 nm. Otros detalles experimentales se recogen en el apartado 2.4.4.

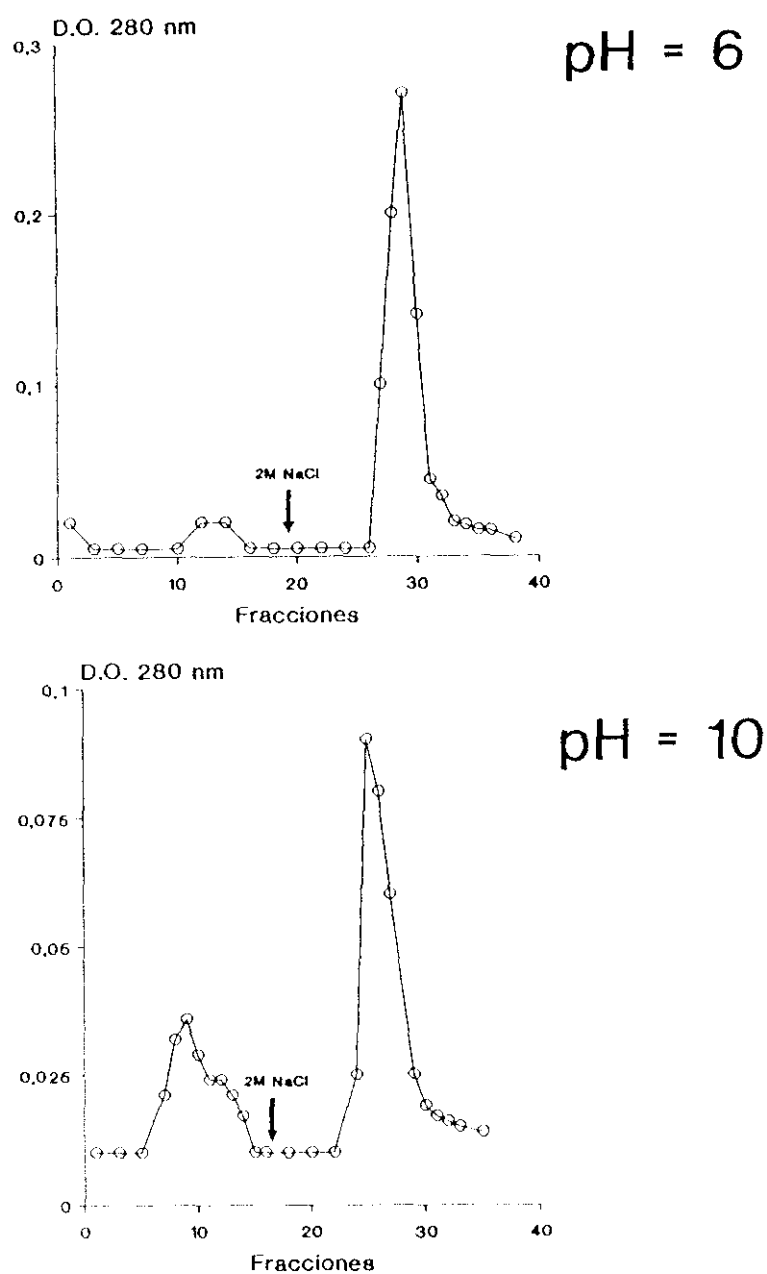


Fig. 3.46. Fraccionamiento de la α -sarcina en Blue Sepharose, equilibrada a distintos valores de pH. En la figura se recogen los perfiles cromatográficos correspondientes a los experimentos de interacción de la α -sarcina con Cibracron Blue F3GA en los que la resina fue equilibrada a valores de pH 6 y pH 10. Las condiciones experimentales en las que se llevaron a cabo las cromatografías quedan recogidas en la tabla 3.10. Las columnas se eluyeron con 2 M NaCl, en el tampón de equilibrado (\downarrow). Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó la absorción a 280 nm. Otros detalles experimentales se recogen en el apartado 2.4.4.

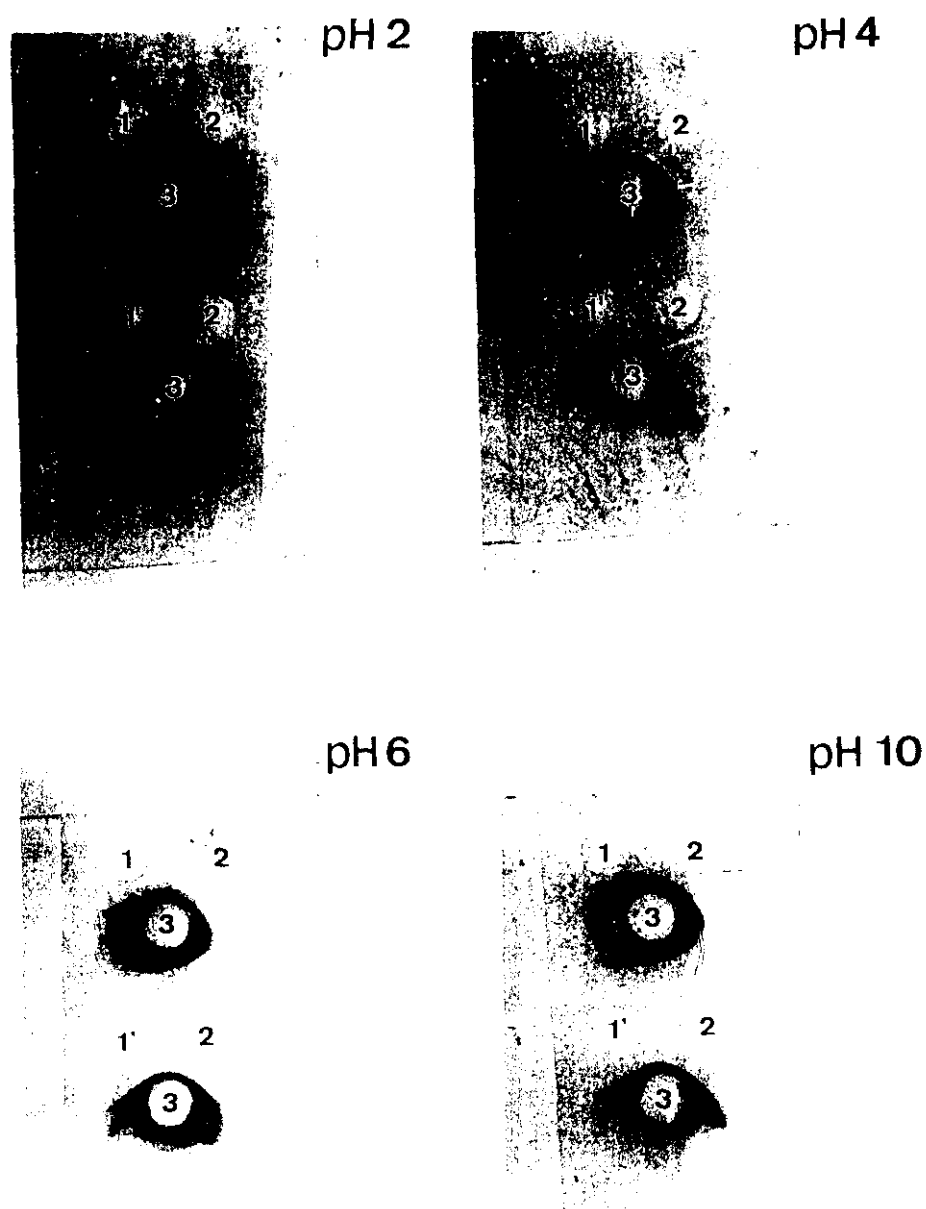


Fig. 3.47. Análisis por inmunodifusión doble de las fracciones de α -sarcina unidas a Blue-Sepharose en las cromatografías realizadas a distintos valores de pH

La inmunodifusiones se realizaron en placas de agarosa al 1% p/v en el tampón habitual (apartado 2.5.4.1.). En los pocillos se aplicaron las siguientes muestras : pocillos 1 y 1'). 1 μ g y 1.5 μ g de una muestra patrón de α -sarcina. pocillos 2) 1.5 μ g de las fracciones eluidas de la columna de Blue Sepharose, equilibrada a los valores de pH indicados, con alta fuerza iónica (estas fracciones se corresponden con las representadas en las figuras 3.45. y 3.46.. En el caso de la cromatografía realizada a pH 4, se aplicó el denominado pico 2.) y en los pocillos 3). 50 μ l de un antisuero de conejo contra la α -sarcina.

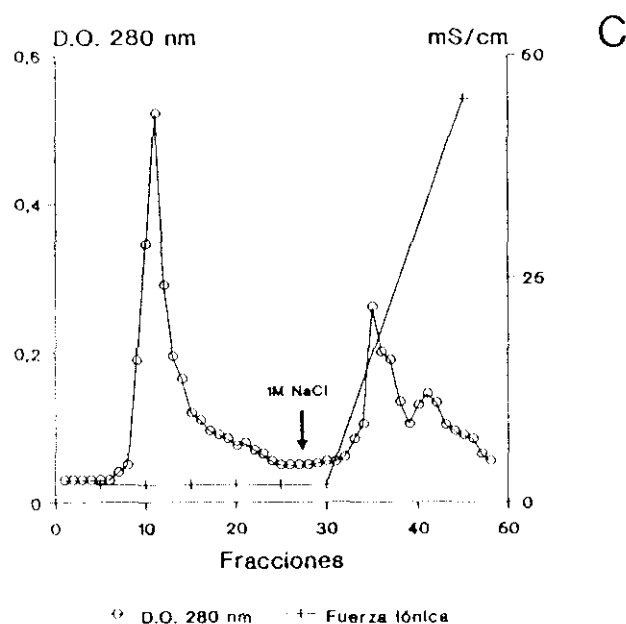
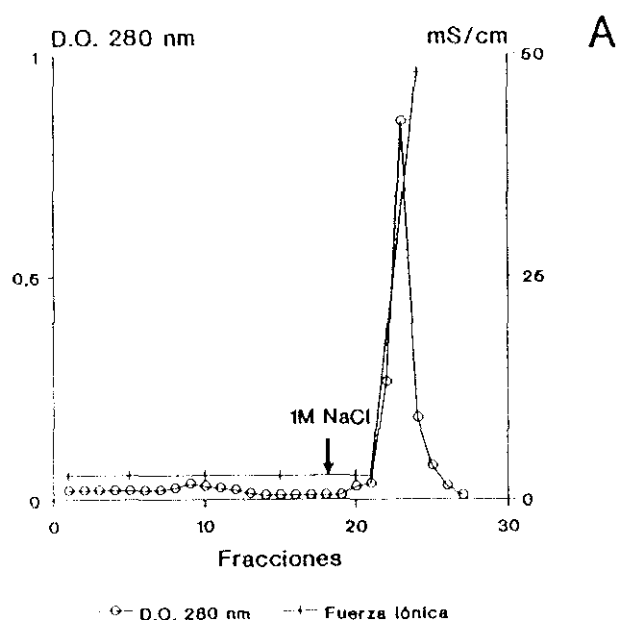


Fig. 3.48. Fraccionamiento de la α -sarcina en Blue Sepharose, bajo diferentes condiciones experimentales

En la figura se recogen los perfiles cromatográficos correspondientes a los experimentos de interacción de la α -sarcina con Cibacron Blue F3GA en las condiciones experimentales denominadas A y C. En ambos casos, se cargaron 2 ml de α -sarcina de una solución de 3 mg/ml, en una columna de 1.5 cm x 4.6 cm de Blue Sepharose equilibrada en tampón 0.01 M Tris HCl, pH 7.4, 0.02 M NaCl en las condiciones experimentales A y en tampón 0.1 M fosfato sódico, pH 7.4, en las condiciones experimentales C. Las columnas fueron eluidas con 1 M NaCl en el tampón de equilibrado (\downarrow). Durante la cromatografía se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó la absorción a 280 nm y la fuerza iónica. Otros datos experimentales se recogen en el apartado 2.4.4.

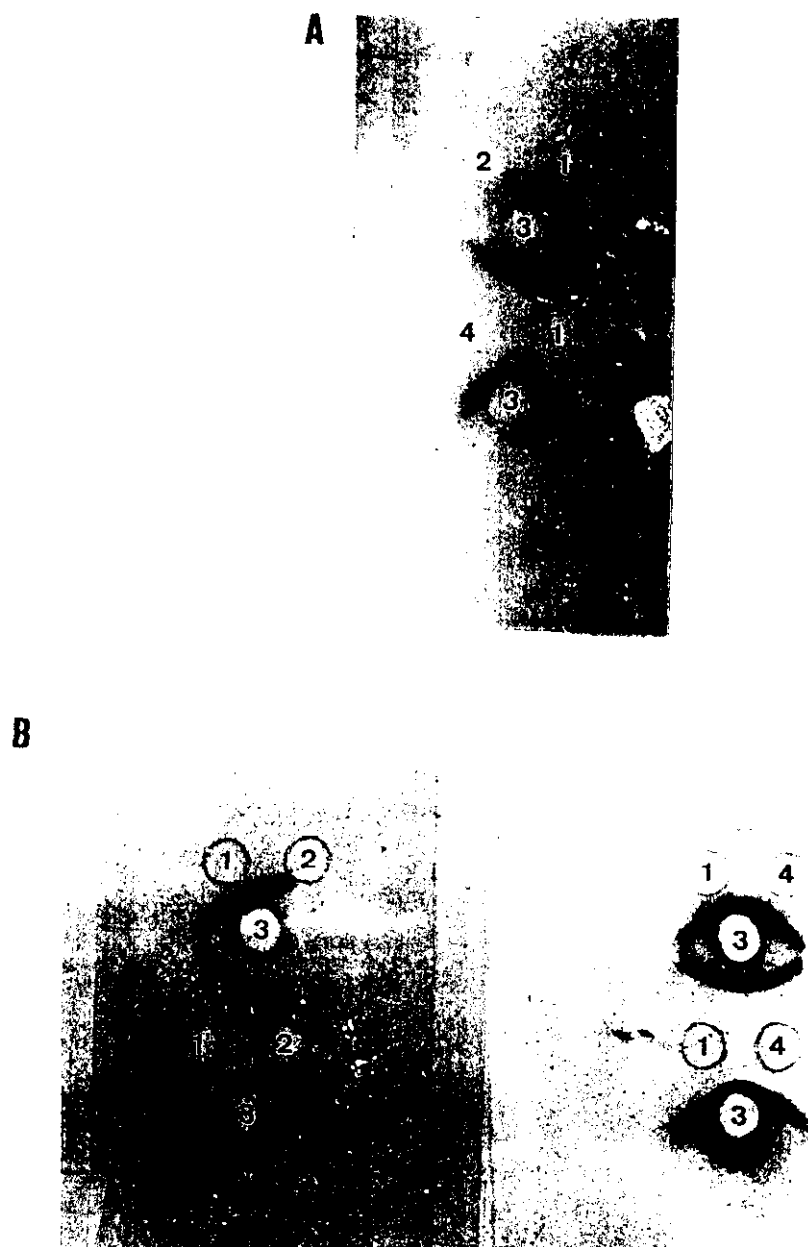


Fig. 3.49. Análisis por inmunodifusión doble de las fracciones de α -sarcina obtenidas a partir de la elución de las columnas de Blue Sepharose, equilibrada a distintos valores de pH, con alta fuerza iónica. Las inmunodifusiones se llevaron a cabo en placas de agarosa al 1% p/v en el tampón habitual (apartado 2.5.4.1.).

En A) se aplicaron las siguientes muestras: pocillos 1). 1 μ g de una muestra patrón de α -sarcina, pocillo 2). 1 μ g de la fracción no unida y pocillo 4). 1 μ g de la fracción unida a Blue-Sepharose de la cromatografía realizada en las condiciones experimentales denominadas como C (tabla 3.10. y figura 3.48.), y pocillo 3). 50 μ l de un antisuero específico contra la α -sarcina.

En B) se aplicaron las siguientes muestras: pocillos 1 y 1'). 1.5 μ g y 2 μ g, respectivamente, de una muestra patrón de α -sarcina, pocillos 2 y 4). 1.5 μ g de los picos 1 y 2, respectivamente, eluidos de Blue-Sepharose, equilibrada a pH 4 (estos se corresponden con los representados en la figura 3.45.), y pocillos 3). 50 μ l de antisuero de conejo contra la α -sarcina.

(48% no unido frente a 52% unido). En las figuras 3.48. se recogen los perfiles cromatográficos obtenidos en estas condiciones.

Las distintas fracciones obtenidas fueron analizadas por inmunodifusión contra un antisuero de conejo contra la α -sarcina, según se recoge en las figuras 3.47. y 3.49. Estas inmunodifusiones permitieron observar como las fracciones unidas a la columna de Cibacron Blue, que eluyen en un sólo pico, muestran una reacción cruzada completa con la muestra de α -sarcina utilizada como patrón. Sólo cuando la columna había sido equilibrada a pH 4 en la que, según se observa en la figura 3.45., la fracción retenido a la columna eluyó en dos picos, el material que contenía en pico denominado como 1 no presentaba reacción cruzada con la proteína.

3.4.2. Fraccionamiento en Affi-Gel Blue de distintas toxinas de una sola cadena

Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos similares de interacción de 6 de las toxinas utilizadas con una columna de Affi-Gel Blue, equilibrada en tampón 0.1 M fosfato sódico, pH 7.4. Esta resina es una resina comercial en la que las moléculas de Cibacron Blue F3GA se unen a una matriz de agarosa.

En todos los casos se determinó también el porcentaje de proteína unida y no unida a la columna, con respecto al total de proteína recuperada tras el experimento (ver tabla 3.11.).

Como puede observarse, tres de las toxinas ensayadas, la cadena A de la ricina, la gelonina y la briodina interaccionan de forma mayoritaria con la columna, con porcentajes que oscilan entre un 96% y un 71% del total del material recuperado. De las tres proteínas restantes, la PAP y la mitogillina, no presentan capacidad de interacción con el colorante en las condiciones ensayadas, y la fracción de α -sarcina que queda retenida en la columna es de un 41%.

Los distintos porcentajes de fijación al Cibacron Blue F3GA obtenidos para la α -sarcina en las dos resinas estudiadas (un 41% unido a Affi-Gel Blue frente a un 52% unido a Blue-Sepharose), pueden ser explicados en base al distinto número de moléculas de colorante unidas por gramo de resina y a la distinta capacidad de retención de las mismas. El Affi-Gel Blue contiene aproximadamente 1.9 mg de colorantes por ml de gel, según los datos recogidos por Bio-Rad, mientras que la Blue-Sepharosa presenta 1.2 mg/ml, según fue calculado por espectrofotometría de absorción (ver apartado 2.4.3.2.) y las matrices utilizadas presentan distintas características.

El hecho de que la naturaleza de la interacción de las proteínas con los colorantes triazínicos no haya sido aclarada, dificulta la posibilidad de establecer una hipótesis concreta que explique el distinto comportamiento observado en las toxinas. Así, para algunas enzimas, las interacciones son similares a las que se establecen entre estas y su ligando correspondiente, ya que estos colorantes pueden considerarse como análogos de sustrato (433), en otras casos, se establecen interacciones de

Tabla 3.11.

toxina	recuperación (%)	fracciones	
		no unida (%)	unida (%)
RCA	86	19	81
briodina	66	29	71
gelonina	65	4	96
PAP	88	100	0
α -sarcina	91	59	41
mitogillina	80	90	10

Figura 3.50.

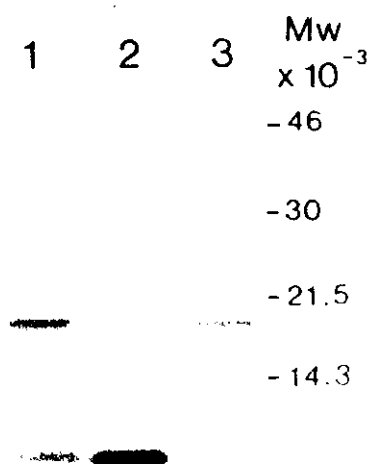


Tabla 3.11. Fraccionamiento de las distintas toxinas en Affi-Gel Blue

Una muestra de 1 ml de cada una de las proteínas, con una concentración de 0.5 mg/ml, fue cargada en columnas de 1.0 cm x 2.5 cm de Affi-Gel Blue, equilibradas en tampón 0.10 M fosfato sódico, pH 7.4. El material retenido en las columnas, fue eluido con 0.5 M NaCl en el tampón de equilibrado, a un flujo de 30 ml/h, según se describe en el apartado 2.4.4.2. En la tabla se recoge el porcentaje de recuperación del material cargado en cada cromatografía, así como los porcentaje correspondientes a cada una de las fracciones obtenidas para las distintas toxinas. RCA = cadena A de la ricina, PAP = toxina antiviral de *Phytolacca americana*.

Fig. 3.50. Gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las distintas fracciones de α -sarcina, obtenidas en Affi-Gel Blue

Las muestras fueron cargadas en un gel Phastgel en un sistema de microprocesado automático, según se describe en el apartado 2.3.7.3. Las muestras aplicadas fueron las siguientes: pocillo 1. 3 μ g de la muestras de α -sarcina, antes de la cromatografía, pocillo 2. 3 μ g de la fracción unida a Affi-Gel Blue y pocillos 3. 2.5 μ g de la fracción no unida a Affi-Gel Blue.

naturaleza iónica debido a la carga neta de las proteínas o incluso, pueden aparecer implicados componentes hidrofóbicos en las mismas (454,455).

A partir de las características que presentan las toxinas utilizadas (ver tabla 2.1), no es posible establecer una relación clara entre la distinta capacidad de interacción con el Cibracon Blue 3FGA y algunos parámetros como el punto isoeléctrico o su distinto peso molecular. Así, mientras que la gelonina ($pI=8.1$) interacciona mayoritariamente con la columna, la PAP no queda retenida ($pI=8.4$), aún cuando sus puntos isoeléctricos son similares y tienen pesos moleculares prácticamente idénticos. Una diferencia similar se observa entre la briodina y las aspergilinas, que presentan puntos isoeléctricos superiores a 9.5.

Sólo el hecho de que las tres proteínas que interaccionan de forma mayoritaria con el Cibracon sean glicoproteínas (RCA, gelonina y briodina), frente a las otras tres que carecen de glicosilación (PAP, mitogillina y α -sarcina), puede ser la causa de este distinto comportamiento. Por tanto, la interacción observada, en las condiciones descritas, podría estar en función de las moléculas de hidratos de carbono presentes en la molécula, y no dependería del centro activo de la toxina.

El análisis en PAGE-SDS de las dos fracciones de α -sarcina obtenidas en Affi-Gel Blue se recoge en la figura 3.50. Como puede observarse, la muestra de proteína utilizada en este experimento presenta dos bandas de pesos moleculares diferentes, que se separan tras la cromatografía (pocillo 1). La fracción que interacciona con el colorante presenta una mayor movilidad que corresponde con un peso molecular de 14.000 (pocillo 2), mientras que la fracción no retenida tiene una movilidad semejante a la proteína nativa (pocillo 3). Ambas fracciones son reconocidas por un antisuero específico contra la α -sarcina y presentan actividad en lisado de reticulocitos y en células del melanoma MeWo (ver tabla 3.12.).

La aparición de esta segunda banda en las muestras de α -sarcina puede ser explicada en base a dos razones: en primer lugar, durante el cultivo del hongo, cualquier descuido en la manipulación de los medios puede dar origen a la contaminación de los mismos con bacterias capaces de segregar al medio de cultivo enzimas proteolíticas, que dan origen fragmentos de digestión de la proteína, los cuales mantienen parcialmente la actividad ribonucleasa; por otro lado, debido a la elevada carga neta positiva que presenta la α -sarcina, puede interaccionar con metabolitos de bajo peso molecular presentes en el medio de cultivo.

Estas sustancias, cuya naturaleza aún no ha sido determinada, podrían inducir modificaciones en las características de la proteína, alterando su capacidad de fijación de SDS y, por tanto, su movilidad electroforética o modificando su inmunogenicidad, según ha sido demostrado por Salvarelli y col (456). De esta forma, es posible explicar la ausencia de reacción cruzada con el antisuero de algunas de las fracciones obtenidas de Blue Sepharose (ver figura 3.49. B).

Tabla 3.12.

inhibición síntesis de proteínas en:			
fracción	línea celular		lisado reticulocitos
	MCF 7	MeWo	
	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	IC ₅₀ (Mx10 ⁶)	IC ₅₀ (Mx10 ¹²)
RCA			
unida ²	0.11	0.20	9.0
no unida	0.085	—	25.0
briodina			
unida ²	0.08	— ¹	15.0
no unida	0.6	—	—
gelonina			
unida ²	0.095	0.034	29.0
no unida	N.D.	N.D.	—
PAP			
no unida	0.65	0.36	4.4
α-sarcina			
unida	—	0.51	300.0
no unida ²	0.24	0.11	3.0
mitogillina			
unida	—	N.D.	0.87
no unida ²	1.30	N.D.	0.12

Tabla 3.12. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistema libre de células y en cultivos celulares de las distintas fracciones obtenidas en Affi-Gel Blue

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀ obtenidos en experimentos de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos (ver apartado 2.10.1.1.) y en células de las líneas MCF 7 y MeWo (ver apartado 2.10.2.3.1.), de las fracciones unida y no unida a Affi-Gel Blue obtenidas en el fraccionamiento de las distintas toxinas.

¹) Como (—), se indica cuando los valores de inhibición de síntesis de proteínas obtenidos no alcanzan el 20% con las concentraciones mayores ensayadas (10⁻⁴M en los experimentos de toxicidad y 10⁻³ M en los experimentos realizados en lisado de reticulocitos)

²) Fracción mayoritaria de cada una de las muestras, según se recoge en la tabla 3.11.

N.D. no determinado.

3.4.3. Estudio de la actividad de las fracciones obtenidas en Affi-Gel Blue

La actividad de las distintas fracciones obtenidas en Affi-Gel Blue, fue determinada en experimentos de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo y en células de las líneas MeWo y MCF 7. Los valores de IC_{50} obtenidos en cada experimento quedan recogidos en la tabla 3.12.

Como puede observarse, en todos los casos, la fracción mayoritaria obtenida en Affi-Gel Blue para cada una de las toxinas, presenta los niveles de actividad más elevados en ambos sistemas. Como fracción mayoritaria se entiende aquella que representa el mayor porcentaje del total del material recuperado.

En los experimentos de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos se pudo observar como las fracciones no unidas a Affi-Gel Blue de la gelonina y de la briodina, no resultaron activas a las concentraciones mas elevadas ensayadas (10^{-9} M). La fracción ligada a la columna de la cadena A es 2.7 veces más activa que la no ligada, mientras que las fracciones unidas de α -sarcina y de mitogillina son 100 y 8 veces más activas, respectivamente, que las correspondientes fracciones no ligadas.

Estas diferencias se tradujeron en distintos niveles de citotoxicidad sobre las líneas celulares en cultivo, ya que tambien las fracciones mayoritarias resultaron las más toxicas. Tambien en este caso, algunas de las fracciones minoritarias no presentaron actividad sobre las células a concentraciones de 10^{-6} M.

Por tanto, la cromatografía en Affi-Gel Blue permite obtener, a partir de algunas de las muestras de toxina utilizadas y en las condiciones descritas, fracciones que presentan mayor actividad que la muestra original, y que se diferencian por su capacidad de interacción con los colorantes triazínicos en las condiciones descritas. Estas fracciones pueden estar compuestas por especies moleculares que presentan características distintas (distinto grado de glicosilación, interacción con componentes de bajo peso molecular, etc) o que han perdido parte de su actividad durante el proceso de extracción o de purificación.

3.5. Estudio del comportamiento *in vivo* de las toxinas, en modelos animales

3.5.1. Toxicidad en ratones Balb/c

Los estudios de toxicidad *in vivo* de estas toxinas han sido llevados a cabo en ratones Balb/c, que fueron inoculados por via intraperitoneal con muestras de ricina, de su cadena A, de restrictocina y de briodina. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la tabla 3.13.

Como puede observarse, los ratones inoculados con 5 μ g de ricina presentaron un tiempo de supervivencia estimado en 18.75 ± 3.5 horas, mientras que los inoculados con dosis 60 veces mayores

Tabla 3.13.

toxina	dosis máxima ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	tiempo de supervivencia (horas)	LD ₅₀ (1) ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)
ricina	5	18.75 \pm 3.5	0.25
RCA	300	>168	—
restrictocina	500	>168	—
briodina	600	>168	—

Tabla 3.13. Toxicidad *in vivo* de las toxinas en ratones Balb/c inoculados por vía intraperitoneal

Grupos de 3 ratones para cada experimento, fueron inyectados intraperitonealmente con distintas dosis de cada una de las toxinas, según se describe en el apartado 2.11.1. Tras la inoculación, se estimó el tiempo de supervivencia de los animales o se les observó durante catorce días. El valor de LD₅₀ (dosis letal 50) para la ricina fue estimado por el método de Lison a los dos días tras la inyección (449) según se describe en el apartado 2.11.2. En la tabla se indican las dosis máximas de cada toxina inoculadas en los ratones.

de la cadena A de la ricina y 100 y 125 veces mayores de restrictocina y de briodina, respectivamente permanecían vivos tras 7 días de inoculación. La dosis letal 50 (LD₅₀) estimada para la ricina por el método de Lison (449) fue de 0.25 µg/ratón (con un grado de confianza del 95% entre 0.13 µg y 0.36 µg), a las 48 horas tras la inoculación.

Los ratones inyectados con ricina fueron diseccionados tras la muerte y se analizó el estado de los distintos órganos y tejidos. De esta forma pudo observarse la presencia de puntos de necrosis en el hígado como uno de los síntomas más evidente, apareciendo alteraciones en otros tejidos tales como los pulmones o el bazo. Los ratones inoculados con restrictocina y briodina no presentaron alteraciones evidentes en los tejidos analizados.

3.5.2. Inmunogenicidad en ratones de la toxinas de cadena única

La capacidad inmunogénica de las toxinas fue examinada también en ratones Balb/c, que fueron inmunizados siguiendo los distintos protocolos descritos en el apartado 2.5.3.1. En todos los casos, tras la última inoculación, se comprobó la presencia de respuesta contra el antígeno en el suero de los ratones por medio de un radioinmunoensayo en fase sólida.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.14., en la que aparecen reflejan los índices de unión obtenidos para los sueros de los animales inmunizados y para los sueros controles.

El índice de unión obtenido para una dilución 1:100 de los sueros de los ratones inoculados con restrictocina (método 1), resultó ser menor que el valor obtenido en los sueros control, mientras que los sueros de los animales inoculados con la cadena A de la ricina, presentaron un valor medio de 44.6.

En el segundo método de evaluación (diluciones 1:125 de los sueros) el índice de unión de los sueros control presentó un valor medio de 2.5, por lo que se consideraron positivos los sueros que alcanzaron un valor en el índice de unión superior a 3. Como puede observarse, los sueros de los animales inoculados con la cadena A de la ricina, la gelonina y la PAP, presentaron índices de unión positivos (entre 4.1 y 5.2) mientras que los valores obtenidos en los sueros de los animales tratados con la α-sarcina arrojaron un valor medio de 2.8.

Por tanto, en ambos experimentos, todas las muestras de toxina utilizadas provocaban repuesta inmune en los animales cuando eran inoculadas sin coadyuvante, excepto las preparaciones de α-sarcina y restrictocina.

Como control positivo del experimento se ensayó por el método 1, un suero de conejo anti α-sarcina obtenido según se describe en el apartado 2.5.1.2. Este suero presentó un índice de unión de 51.2 en los pocillos incubados con la α-sarcina.

Con el fin de inducir en los ratones una respuesta inmune contra la toxina de *A. giganteus*, se llevaron a cabo distintos protocolos de inmunización (ver apartado 2.5.3.2.) después de los cuales, se procedió a valorar los índices de unión para una

Tabla 3.14. Estudio de la inmunogenicidad de las toxinas en ratones Balb/c

Grupos de 2 ó 3 ratones Balb/c fueron inoculados con muestras de toxinas por vía intravenosa o subcutánea, según el método descrito en el apartado 2.5.3.1. En la tabla se recogen los valores de reactividad de los sueros de ratones inmunizados con las distintas toxinas. Estos valores han sido obtenidos por radioinmunoensayo realizado según se describe en el apartado 2.8.2.2.2. El índice de Unión se define como el cociente entre el número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos incubados con la dilución correspondiente del suero de ratón entre el número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos incubados con medio de cultivo RPMI 1460. Las diluciones de suero utilizadas en el experimento han sido de 1:10 en el método 1 y de 1:125 en el método 2. Ambos métodos se describen en el apartado 2.5.3.1. La ausencia de valor — para algunas de las toxinas, indica que el método indicado no ha sido utilizado.

Tabla 3.15. Valoración de la inmunogenicidad de la d-sarcina en ratones Balb/c tras distintos protocolos de inmunización

En todos los casos, se inocularon grupo de ratones Balb/c con 100 µg de d-sarcina siguiendo en cada caso, un protocolo de inmunización diferente según se describe en el apartado 2.5.3.2.1. En los sueros de los ratones inoculados, se valoró el índice de Unión de una dilución 1:125 según el método 1, por radioinmunoensayo en fase sólida (ver apartado 2.8.2.2.2.). Se indica el número de sueros positivos con respecto a los ratones inmunizados y el índice de Unión de cada suero. Como control negativo, se utilizó el suero de ratones no inmunizados. Como sueros positivos fueron considerados aquellos que presentaron un valor de índice de Unión superior a 3. El índice de Unión ha sido calculado de la siguiente forma: $\frac{1461 \text{ unido en presencia de una dilución de suero } 1:125}{1461 \text{ unido en presencia de medio de cultivo RPMI } 1460}$.

Tabla 3.14.

inmunógeno	índice de unión por:		número sueros positivos/número ratones inmunizados
	método 1 (1:100)	método 2 (1:125)	
ninguno	5.6	2.0	0/3
α -sarcina	...	2.8	0/3
restrictocina	5.1	...	0/3
RCA	44.6	5.1	5/5
gelonina	...	5.2	2/2
PAP	...	4.1	2/2

Tabla 3.15.

inmunógeno	número de sueros positivos/número ratones inmunizados	índice de unión método 2 (1:125)
ninguno	0/3	2.0
α sarcina		
1. 100 μ g en PBS	0/3	2.8
2. +adyuvante Freund	3/3	4.2
3. +adyuvante Freund +0.25% glutaraldehído	3/3	6.5
4. +adyuvante Freund +0.25% glutaraldehído +KLH	3/3	9.0

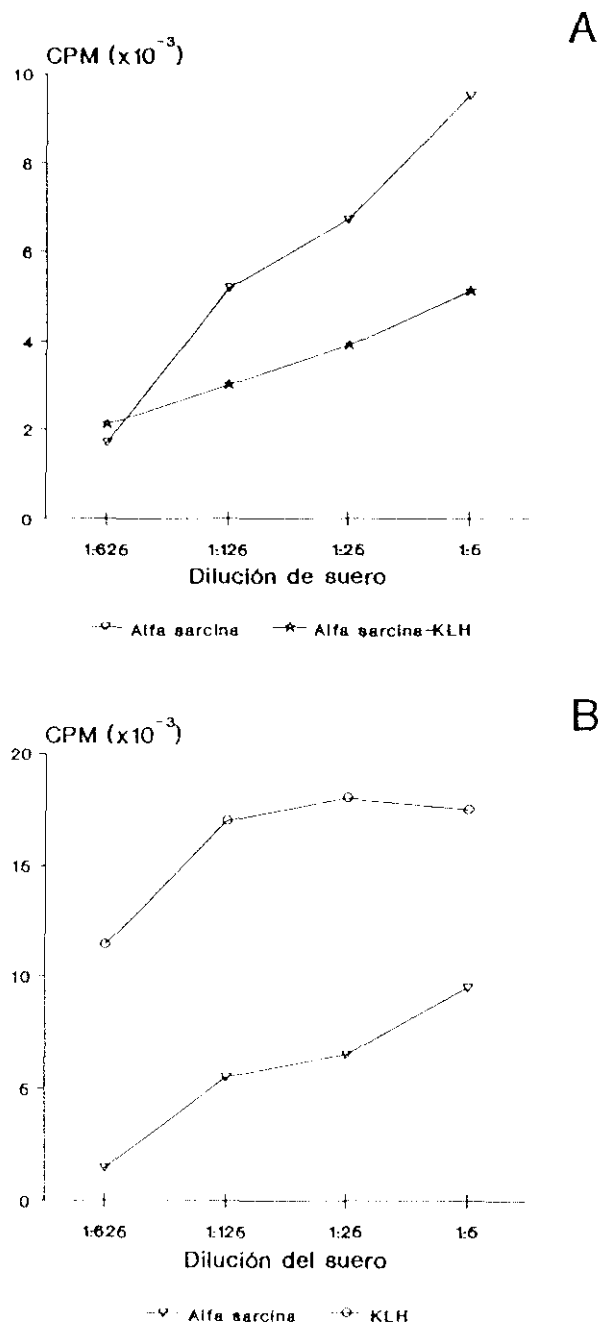


Fig. 3.51. Valoración de la respuesta inmune de ratones inoculados con α -sarcina en presencia o ausencia de KLH

A) Distintas diluciones del suero de ratones inoculados con una muestra de α -sarcina o α -sarcina polimerizada con glutaraldehído y en presencia de KLH (ver métodos de inmunización descritos en el apartado 2.5.3.2., fueron incubadas en placas en cuyos pocillos cubiertos con α -sarcina según el método descrito en el apartado 2.8.2.2.2.

B) Distintas diluciones de suero de ratones inoculados con una muestra de α -sarcina polimerizada con glutaraldehído y en presencia de KLH, fueron incubadas en placas en cuyos pocillos habían sido fijadas α -sarcina y KLH.

En ambas figuras se representa el número de cuentas por minuto (cpm) de proteína A marcada con ^{125}I , fijadas a pocillos cuando estos se incuban con las distintas diluciones del suero. Los detalles sobre el método experimental se recogen en el apartado 2.8.2.2.2.

dilución 1:125 de cada uno de los sueros, según el segundo método de valoración. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la tabla 3.15.

Como puede observarse, el índice de unión aumentó progresivamente con cada uno de los protocolos utilizados, de manera que, la utilización de adyuvante completo permitió obtener sueros con índices de unión superiores a 4, similares a los obtenidos para la PAP. La polimerización del inmunógeno con una concentración final de 0.25 % de glutaraldehído y la utilización de moléculas transportadoras como la hemocianina del molusco *Megathura crenulata* (KLH o "Keyhole Limpet Hemocyanin"), permitieron obtener sueros con índices de unión 3 veces superiores a los obtenidos con la proteína nativa.

La KLH, proteína de peso molecular entre 4.5×10^5 y 1.3×10^7 , resultan altamente inmunogénicas y favorecen la obtención de una respuesta en los animales, permite elevar el nivel de anticuerpos en circulación y el nivel de respuesta inmune contra aquellos antígenos unidos a ella (ver figura 3.51. A). Aunque en estos animales aparece una respuesta inmune mucho mayor contra la molécula de KLH, que contra la α -sarcina, según se puede observar en la figura 3.51. B.

Cuando la α -sarcina fue polimerizada en presencia de una concentración de 0.25% de glutaraldehído e inoculada tras su emulsión en adyuvante completo de Freund, se observó en los animales un buen nivel de respuesta inmune. Este método puede ser considerado como el protocolo más apropiado para la inmunización de los ratones.

3.5.3. Biodistribución de las toxinas en conejos New Zeland

3.5.3.1. Aclaramiento de las toxinas en sangre

El estudio del aclaramiento en sangre de la restrictocina y de la ricina se llevó a cabo en conejos de la raza New Zeland de entre 2 kg y 3 Kg de peso, según se describe en el apartado 2.11.3.

Los conejos fueron inyectados por vía intravenosa con alícuotas de las proteínas marcadas con ^{125}I , que contenían entre 5 μg y 6 μg de toxina y, a distintos intervalos de tiempo, se extrajeron muestras de sangre en las que se estimó el porcentaje de radiactividad remanente. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 3.52. en la que quedan representados los porcentajes de radiactividad remanente con respecto al tiempo de extracción, entre las 0 horas y las 24 horas.

Como puede observarse, la cinética de ambas toxinas se presentó en forma de curva bifásica, con una primera fase o de distribución en la que la concentración de proteína en sangre descendió rápidamente y que representa la rápida distribución de las proteínas desde el sistema sanguíneo a los compartimentos periféricos, y una segunda fase o de eliminación en la que la pendiente de la curva es mucho menor y que representa la eliminación a través de las distintas vías, básicamente a través del riñón (450).

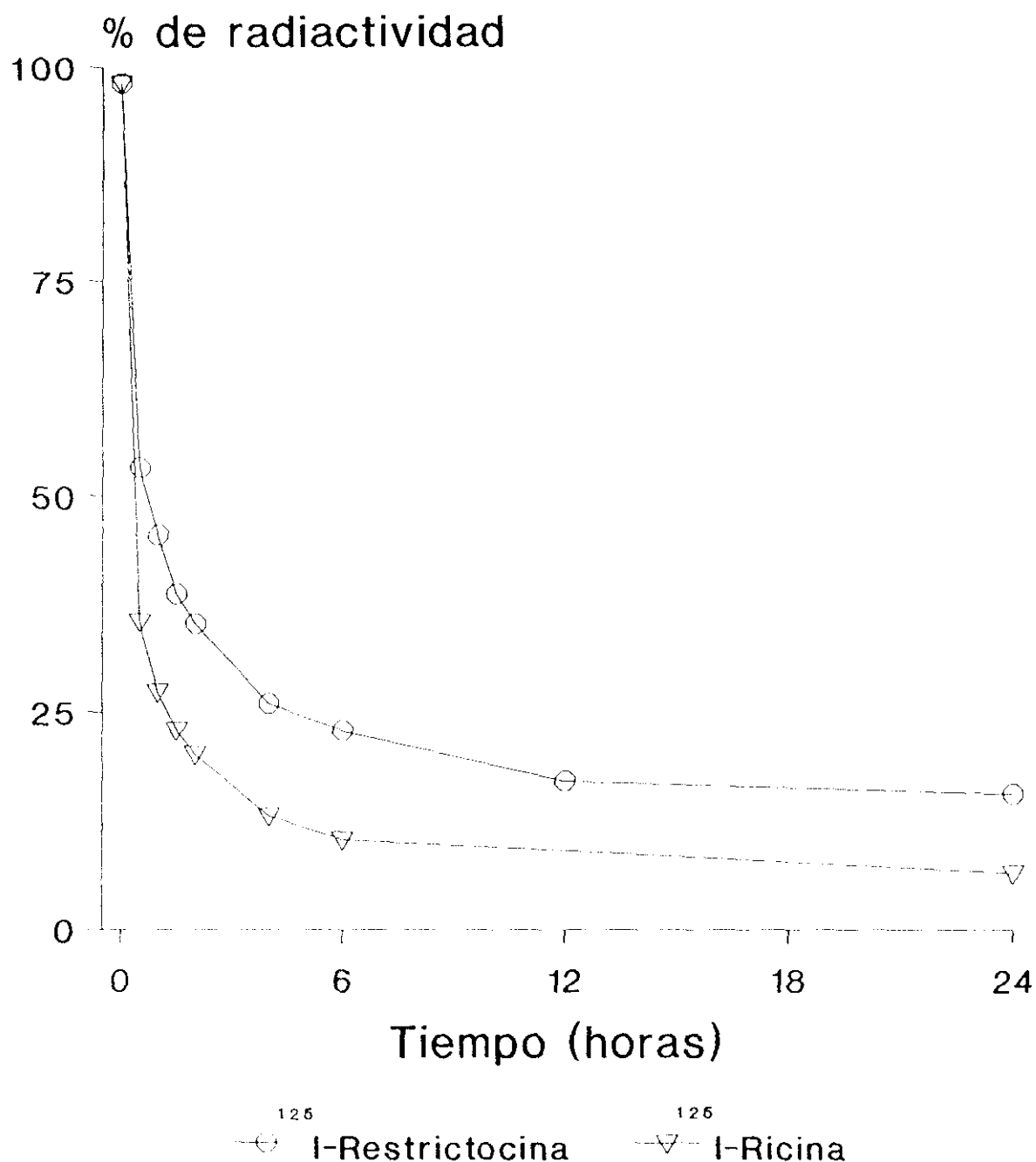


Fig. 3.52. Aclaramiento de las toxinas en sangre

Muestras de ¹²⁵I-ricina y ¹²⁵I-restrictocina, fueron inoculadas por vía intravenosa en conejo New Zealand y, a distintos tiempos se les extrajo una muestra de sangre. En cada caso, se determinó en un contador gamma, el número de cuentas por minuto en un mililitro de cada una de las muestras.

En la gráfica se representa el porcentaje remanente de radiactividad para cada tiempo, considerando el 100% de radiactividad en sangre, el número de cuentas obtenido para la muestra extraída a tiempo 0. Los detalles experimentales se recogen en el apartado 2.11.3.1.

Al cabo de las 24 horas, tiempo máximo del experimento, permanece en sangre alrededor de un 20% de la restrictocina inoculada, mientras que se estima en un 7% la cantidad de ricina. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fodstad y coli (120) en ratón, quienes especifican que la ricina completa, en dosis de 40 ng por ratón, desaparece casi completamente de circulación después de 20 horas mientras que la abrina se mantiene en una concentración relativamente elevada hasta las 40 horas después de la inoculación. Por otro lado, Blakey y Thorpe (69) en experimentos realizados igualmente en ratones Balb/c, inoculados con cantidades de proteína marcada comprendidos entre 10 y 20 µg, obtienen valores de $t_{1/2}$ para la cadena A de la ricina y la correspondiente molécula deglicosilada químicamente de 5.5 minutos y de 8.3 minutos, respectivamente, mientras que al cabo de 2 horas de inyección, se observa que se mantiene en circulación solo un 11% del total de la cadena A deglicosilada y un 8 % de la cadena A completa.

El rápido aclaramiento de la ricina, ha sido atribuida a la presencia de hidratos de carbono en su molécula, que reconocen restos de manosa presentes en los glóbulos rojos u en las células de órganos como el hígado o el bazo (69).

Aunque las diferencias observadas en los tiempos de distribución y de eliminación puedan parecer pequeñas, es conveniente tener en cuenta que ambas proteínas pueden ser consideradas similares desde un punto de vista farmacológico. Por tanto, estos valores resultan significativos y confirman la mayor permanencia en circulación de la restrictocina con respecto a la ricina.

Para intentar dilucidar la manera en que ambas proteínas son transportadas a través de la sangre, se determinó por separado el porcentaje de radiactividad acumulado en coágulo y en plasma, en cada una de las muestras obtenidas. En cada caso, tras la extracción, las muestras se dejaron reposar hasta que se produjo la retracción del coágulo, momento en que fue separado el plasma del coágulo determinando la radiactividad en ambas fracciones.

Las gráficas correspondientes a este experimento se recogen en la figura 3.53., en donde aparece representado el número de cuentas por minuto obtenidos para las muestras de coágulo y de plasma por gramo con respecto al tiempo.

En el caso de la ricina (figura 3.53. B) puede observarse como la mayor cantidad de radiactividad se detecta en el coágulo, en donde el porcentaje de radiactividad remanente disminuye muy rápidamente con respecto al tiempo. En las muestras obtenidas a las 4 horas y las 6 horas después de la inoculación, los valores obtenidos en el plasma y en suero, resultaron prácticamente idénticos. El descenso tan rápido de la cantidad de ricina en el coágulo fue relacionado con la posible fijación de la molécula a los glóbulos rojos, que son rápidamente retirados de circulación y a su capacidad hemaglutinante.

Por el contrario, en el caso de la restrictocina (figura 3.53. A), los porcentajes de radiactividad obtenidos resultaron, en todos los casos, sensiblemente mayores en el plasma que en el coágulo, de manera que, después de 6 horas, se detectó una diferencia de aproximadamente un 10% entre los valores obtenidos

Fig. 3.52.B. Representación logarítmica de los valores de aclaramiento de las toxinas en sangre

En las gráficas se representan los porcentajes de radiactividad obtenidos a los distintos tiempos de extracción en las muestras de sangre de los conejos New Zeland inoculados con alícuotas de ^{125}I -restrictocina (figura A) e ^{125}I -ricina (figura B), según se recoge en el apartado 2.11.3.1. Estos valores se corresponden con los recogidos en la figura 3.52. y en este caso, los porcentajes se representan en escala logarítmica. A partir de las gráficas, se obtuvieron las rectas de la ecuación doble exponencial ($\square - \square$) que definen la cinética bifásica de las toxinas en plasma (450). Los puntos de corte de las rectas obtenidas permiten definir los parámetros A y B (ver apartado 2.11.3.2).

Tabla 3.15.B. Parámetros farmacológicos de las toxinas

En la tabla se recogen los valores obtenidos para los distintos parámetros farmacológicos determinados a partir de las gráficas de aclaramiento de las toxinas. La definición de cada uno de los términos utilizados se recoge en el apartado 2.11.3.2., como C se recoge la fórmula de las rectas que definen el comportamiento farmacocinético de ambas toxinas, cuando son inyectadas en conejos New Zeland.

Figura 3.52.B.

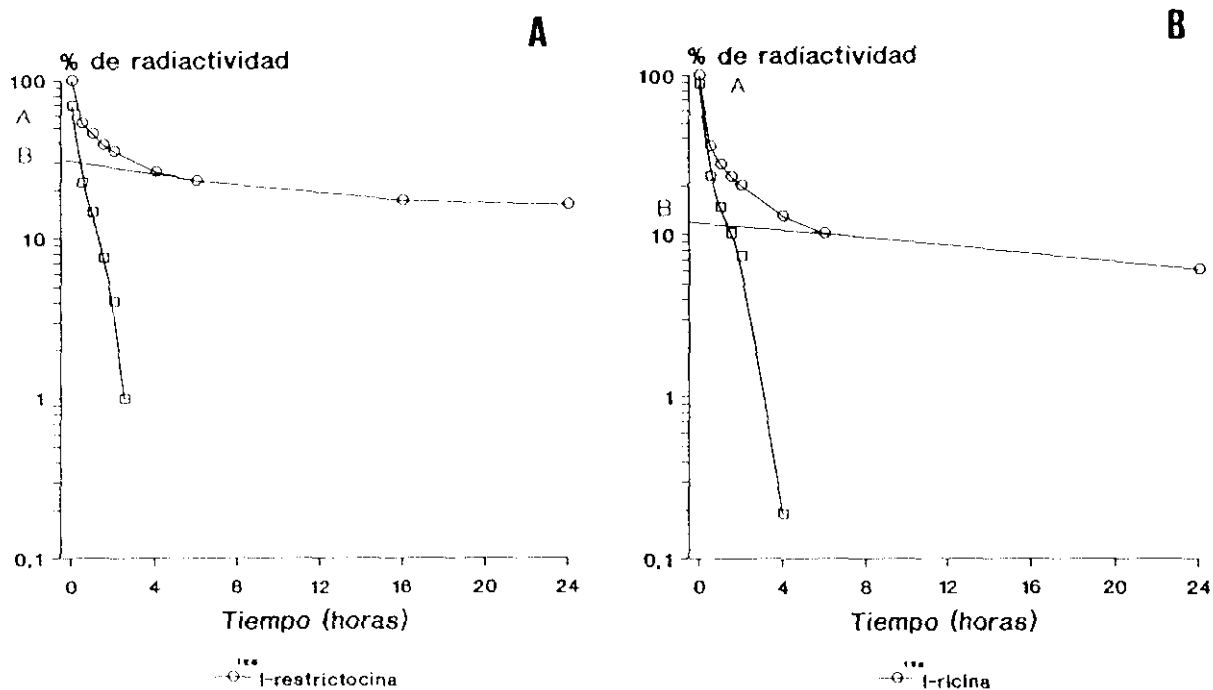


Tabla 3.15.B.

parámetros	restrictocina	ricina
dosis	33.00 ng/ml	33.00 ng/ml
A	29.00 ng/ml	32.10 ng/ml
B	10.26 ng/ml	4.17 ng/ml
α	1.175 h ⁻¹	1.280 h ⁻¹
β	0.011 h ⁻¹	0.043 h ⁻¹
$t_{1/2\alpha}$	0.59 h	0.54 h
$t_{1/2\beta}$	61.40 h	15.85 h
AUC _{0-∞}	907.96 ng*ml ⁻¹ *h	121.98 ng*ml ⁻¹ *h

Ecuaciones:

Restrictocina $C = 29.00 * e^{-1.175t} + 10.26 * e^{-0.011t}$

Ricina $C = 32.10 * e^{-1.280t} + 4.17 * e^{-0.043t}$

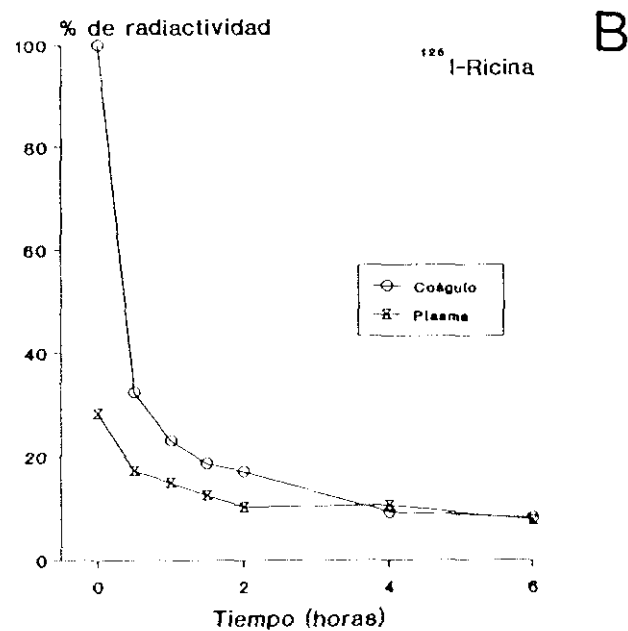
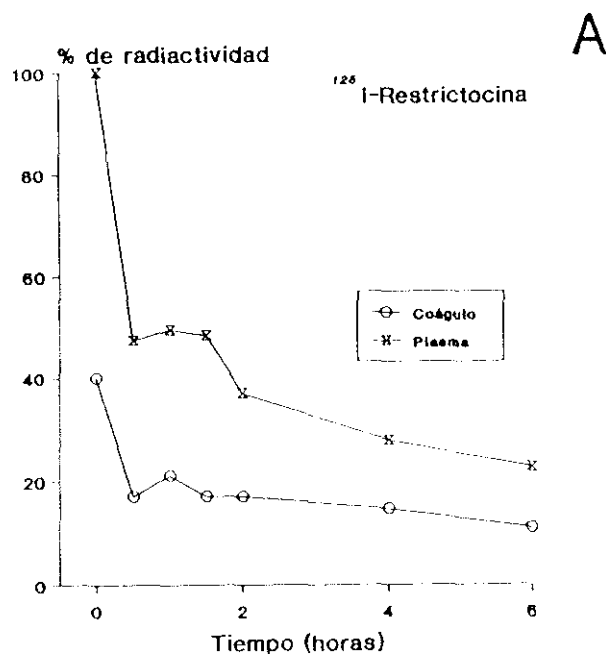


Fig. 3.53. Aclaramiento de las toxinas en coágulo y en plasma

Muestras de 125 I-ricina (gráfica B) y 125 I-restrictocina (gráfica A), fueron inoculadas por vía intravenosa en conejos New Zeland, a los que se les extrajo una muestra de sangre a distintos tiempos. En cada caso, tras la coagulación de la sangre, se esperó a la retracción del coágulo en las muestras y se determinó por separado el número de cuentas por minuto en plasma y en coágulo, en un contador gamma. En las gráficas se representa el porcentaje remanente de radiactividad para cada tiempo, considerando el 100% de radiactividad en sangre, el número de cuentas obtenido para las muestras extraídas a tiempo 0. Los detalles experimentales se recogen en el apartado 2.11.3.1.

en plasma y en coágulo.

Según estos resultados obtenidos en conejo, la restrictocina podría ser transportada, de forma mayoritaria, en disolución en el plasma de modo que su distribución en los distintos tejidos y su eliminación estará relacionada con este hecho.

3.5.3.2. Distribución en tejidos de la ^{125}I -restrictocina

Los niveles de radiactividad de ^{125}I -restrictocina acumulados en los distintos órganos y tejidos, fueron determinadas tras 1 hora y 24 horas después de la inyección. Los datos fueron expresados como porcentaje de la radiactividad total inoculada por gramo de tejido, considerando como el 100% el total de la radiactividad observada en las distintas muestras. También fueron recogidas muestras de orina y de heces a las 4 horas y a las 24 horas.

Estos resultados quedan recogidos, en la figura 3.54. A, en donde puede observarse que el mayor porcentaje de radiactividad se detecta en testículo a las 24 horas de inoculación (31.3 % por gramo de tejido). Dos de los órganos en donde la proteína se acumula preferentemente después de 24 horas son la vesícula biliar (14.6%) y el riñón (7.3%).

Los porcentajes relativos observados en la vesícula biliar no variaron significativamente entre las muestras obtenidas a 1 hora y a 24 horas después de la inoculación. Sin embargo, en el riñón mientras que tras una hora de inoculación se acumula cerca de un 20% del total de la proteína este porcentaje disminuye en más de la mitad después de 24 horas. Ambos resultados, pueden estar relacionados con el mecanismo de eliminación de la proteína que se realiza por filtración glomerular, a través de la orina, por filtración glomerular o a través de la heces (457).

Otros órganos en los que se encontraron niveles significativos de radiactividad fueron el ovario (un 8% a 1 hora y un 7% a las 24 horas), glándulas suprarrenales (un 5% a la hora, que aumenta a un 6.75% después de las 24 horas), intestino, tráquea y médula ósea con valores que oscilan entre 2.5% y 4% tras 1 hora y 24 horas de inoculación. El porcentaje acumulado en hígado por gramo de tejido es ligeramente superior al 3% tras una hora de inoculación y disminuye al cabo de las 24 horas.

Según los datos reportados en la literatura sobre el acúmulo en tejidos de la ricina y su cadena A en estudios llevados a cabo en ratón, los porcentajes de ambas proteínas acumulados en hígado se sitúan en valores próximos a un 40% en hígado tras 1 hora de inyección (69,120,121). Por tanto, los resultados recogidos aquí permiten apuntar que la restrictocina presenta mecanismos de biodistribución distintos a las toxinas vegetales glicosiladas, ya que los hidratos de carbono presentes en su molécula determinan además de su rápida eliminación de la circulación, un acúmulo preferencial en el hígado.

Por otro lado, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que las aspergilas, al menos la restrictocina, se distri-

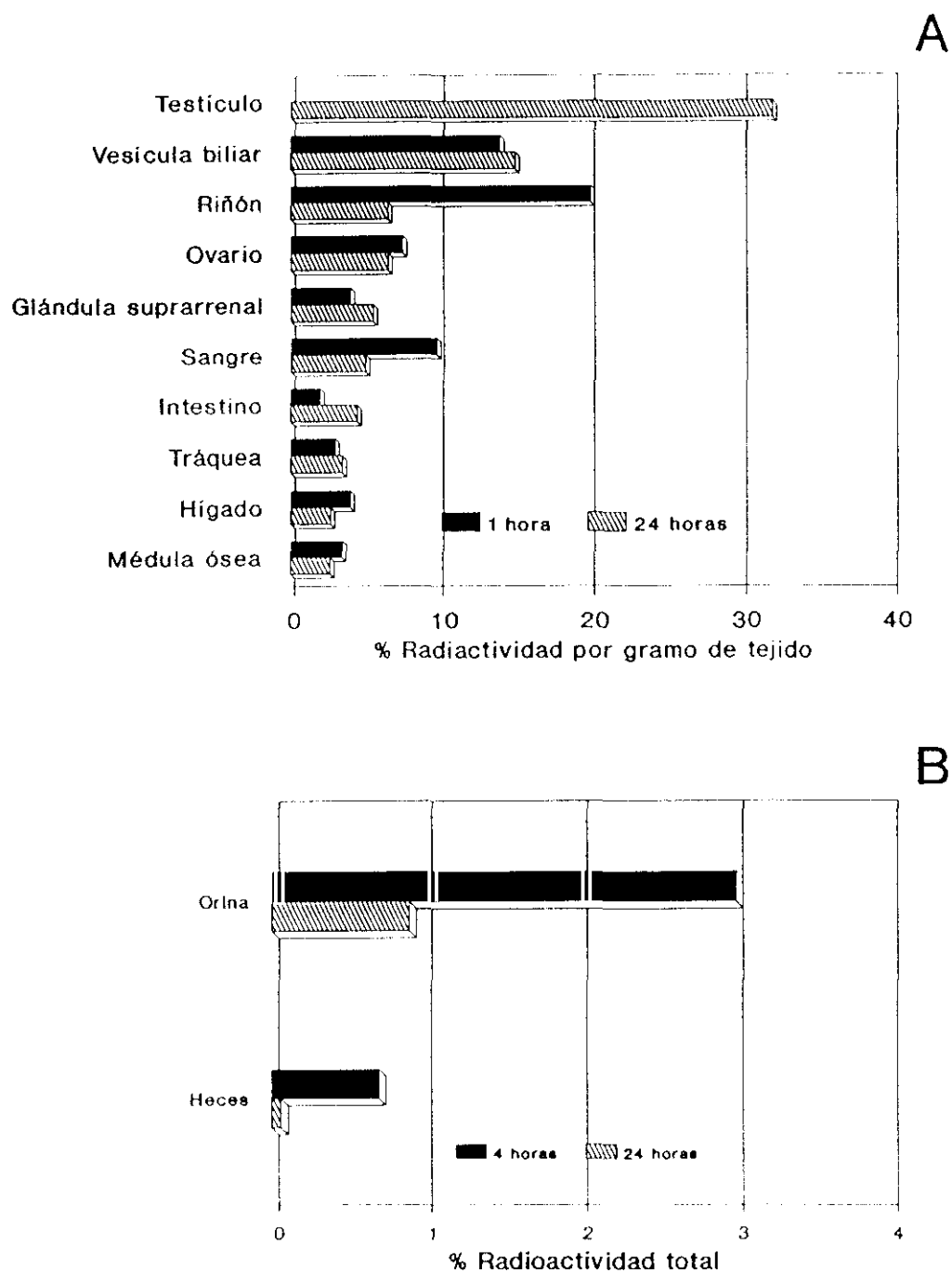


Fig. 3.54. Biodistribución de ^{125}I -restrictocina en tejidos de conejos New Zeland.

A) En la figura se presenta el porcentaje de radiactividad por gramo de tejido con respecto al total de radiactividad, acumulada en los distintos tejidos y órganos de conejos inoculados con muestras de ^{125}I -restrictocina por vía intravenosa. Las muestras de cada tejido fueron obtenidas en distintos animales, sacrificados 1 hora y 24 horas después de la inoculación.

B) En la figura se representa el porcentaje de radiactividad con respecto al total observado en las muestras de orina y de heces de los conejos inyectados con ^{125}I -restrictocina. Estas muestras fueron recogidas tras 4 horas y 24 horas, después de la inoculación.

En ambos casos, las muestras fueron contadas en un contador gamma. Los detalles sobre el procedimiento experimental se recogen en el apartado 2.11.3.3.

buyen por el organismo en disolución en el plasma, lo que permitiría a estas toxinas tener una mayor accesibilidad a órganos y tejidos altamente irrigados como son el ovario, la vesícula biliar, el testículo o incluso, el hígado, en el que la ausencia de glicosilación evita que se acumulen en exceso.

La presencia de radiactividad en orina y en heces, se detectó a las 4 horas y a las 24 horas de la inoculación. Los resultados obtenidos referidos como porcentaje de la radiactividad total inoculada se recogen en la figura 3.54. B. El análisis de estos resultados permite observar como el porcentaje de proteína eliminada por ambas vías es muy pequeño, ya que no sobrepasan el 5% del total de radiactividad inoculada (3.85% en orina tras 24 horas y 0.87% en heces en igual periodo). La restrictocina permanecerá por tanto, durante periodos de tiempo relativamente largos, en el organismo.

3.6. Actividad ribonucleasa de la α -sarcina en polímeros sintéticos de ribonucleótidos

La actividad ribonucleasa de la α -sarcina, ha sido ensayada sobre homopolímeros y heteropolímeros sintéticos de ácidos nucleicos, según se describe en el apartado 2.10.1.2.. Dicha actividad se estudia como incremento de la absorción a 260 nm del sobrenadante de la reacción, cuando una concentración constante de polímero es tratada con cantidades crecientes de proteína. Este aumento de la lectura de la absorción está en relación con la presencia en el sobrenadante de la reacción de los productos de la digestión, que son pequeños fragmentos de polímero que no precipitan en presencia de uranil acetato en condiciones ácidas (448).

Como puede observarse en las figuras 3.55. y 3.56., la α -sarcina manifiesta la mayor actividad sobre polímeros de ácido poliinosínico y ácido policitidílico, digiriendo extensivamente los heteropolímeros de ácido inosínico y ácido citidínico (poli CI), mientras que resulta muy poco activa sobre polímeros de ácido poliuridílico (poli U) y ácido poliadenílico (poli A).

Según describen Yakovlev y col (260), los polímeros de ácido inosínico permiten llevar a cabo este tipo de estudios sobre la actividad ribonucleasa de distintos enzimas purificados a partir del medio de cultivo de bacterias y de hongos, ya que polímeros de otros ácidos como el ácido poliguanílico tienden a agregarse en solución. De esta forma, estos autores atribuyen a la RNasa II de *Aspergillus oryzae* una actividad dependiente de guaninas (260). Por otro lado, los heteropolímeros poli I-poli C tienden a formar en solución estructuras de doble hélice, que permiten estudiar el distinto comportamiento de las ribonucleasas ante ácidos nucleicos de una sola cadena y de doble cadena.

Endo y col (205), en experimentos similares llevados a cabo con la α -sarcina, señalaron que la proteína presentaba una actividad ribonucleasa específica de purinas, ya que digería extensivamente polímeros de ácido adenílico mientras que los niveles de digestión de otros polímeros eran muy inferiores. Sin embargo, los resultados obtenidos aquí, aunque pueden sugerir una preferencia por las bases nitrogenadas derivadas de la purina,

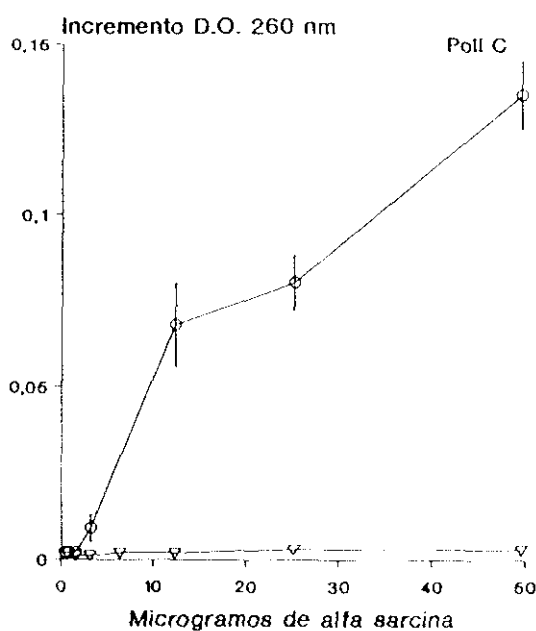
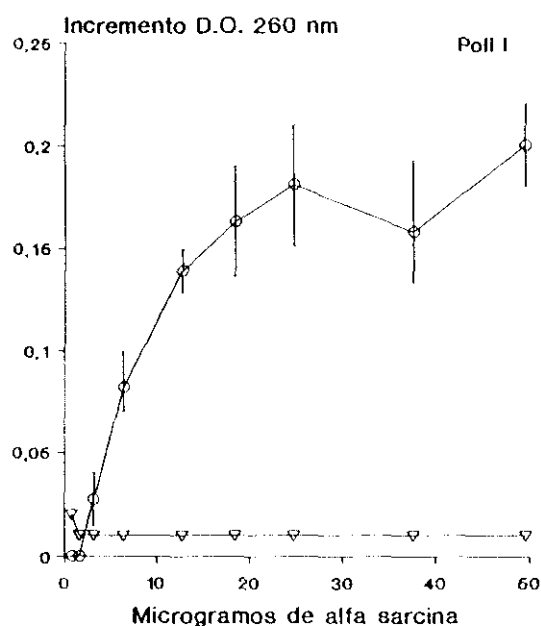


Fig. 3.55. Actividad ribonucleasa de la α -sarcina sobre homopolímeros sintéticos de ácidos nucleicos

En las gráficas se representan las curvas de actividad de digestión de la α -sarcina sobre polímeros de ácido polinosínico, Poli I (A) y ácido policitidínico, Poli C (B). En ambos casos, 50 μ g de homopolímeros fueron sometidos a digestión con distintas cantidades de α -sarcina (O) y albúmina de suero bovino, BSA (▽), a 37° C durante 2 horas. Transcurrido dicho tiempo en el sobrenadante se estimó el incremento de absorción de la densidad óptica a 260 nm con respecto al control en el que no se añadió muestra de proteína. En ambos casos, se representa el valor medio obtenido y la desviación estándar de cada punto. El método experimental se describe en el apartado 2.10.1.2.

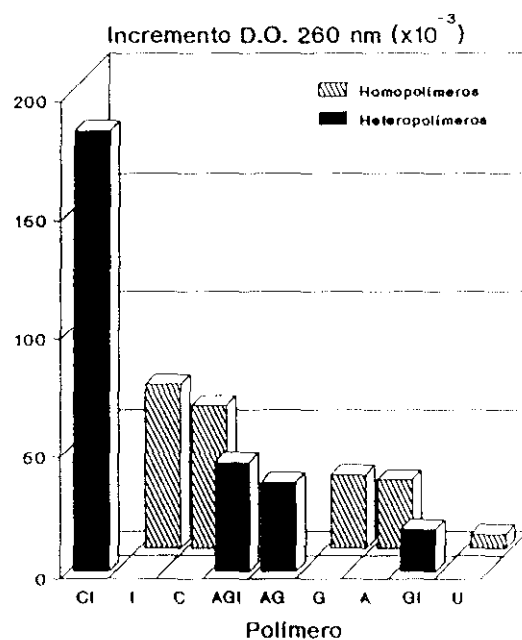
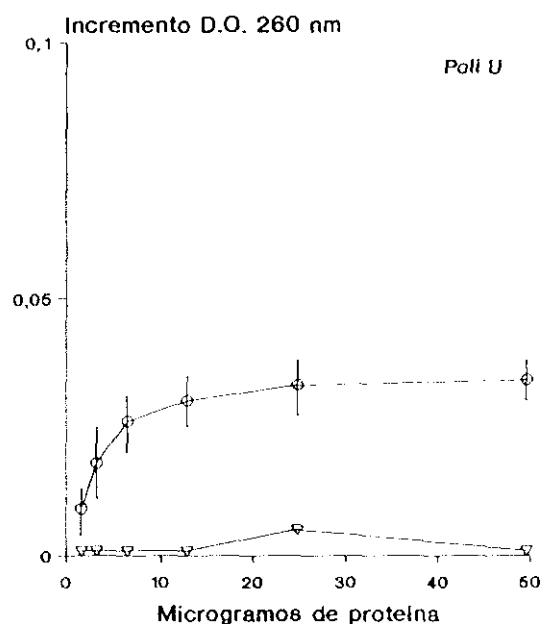


Fig. 3.56. Actividad ribonucleasa de la α -sarcina sobre homopolímeros sintéticos de ácidos nucleicos

A) En la gráfica se representa la curva de actividad de digestión de la α -sarcina sobre polímeros de ácido poliuridínico, Poli U. 50 μ g de homopolímeros fueron sometidos a digestión con distintas cantidades de α -sarcina (○) y albúmina de suero bovino, BSA (▽), a 37° C durante 2 horas. Transcurrido dicho tiempo en el sobrenadante se estimó el incremento de absorción a 260 nm con respecto al control en el que no se añadió muestra de proteína. Para las distintas concentraciones se representa el valor medio obtenido y la desviación estándar de cada punto.

B) 25 μ g de α -sarcina fueron incubados con 50 μ g de cada uno de los homopolímeros y heteropolímeros sintéticos de ácidos nucleicos referidos. Tras la reacción, en el sobrenadante se determinó el incremento de la absorción a 260 nm. En el eje de abscisas se representa el incremento de absorción a 260 nm en milésimas. El método experimental se describe en el apartado 2.10.1.2.

difieren sensiblemente de los expresados por el grupo de Endo y no permiten atribuir a las aspergilinas dicha especificidad.

3.7. Comparación de las aspergilinas con otras ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico

Según ha sido comentado anteriormente, las aspergilinas han sido comparadas con distintas ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico, purificadas a partir del medio de cultivo de distintas especies (205). Las primeras comparaciones en secuencia fueron realizadas por el grupo de Endo, quienes encontraron una homología de aproximadamente el 34% entre la α -sarcina de *Aspergillus giganteus* MDH 18894 y la RNasa U2 de *Ustilago sphaerogena* (205).

En este caso, se llevó a cabo un estudio comparativo de la secuencia de distintas ribonucleasas pertenecientes a este grupo y entre las que existe un alto grado de homología de secuencia, y las aspergilinas (255,256). Para ello y como se describe en el apartado 2.12., se tomaron como puntos de referencia las posiciones que ocupan los aminoácidos implicados en el centro activo de la RNasa I1 de *A. oryzae* (255). Algunas de las características más destacadas de las ribonucleasas utilizadas, quedan recogidas en la tabla 2.8.

Como puede observarse en la figura 3.57., dichos aminoácidos Glu (E) 58, Arg (R) 77 e His (H) 92, aparecen situados en regiones equivalentes en todas las ribonucleasas, incluyendo la α -sarcina, la restrictocina y la mitogillina (ver figura 3.58). Estos aminoácidos coinciden con las posiciones Glu (E) 96, Arg (R) 121 e His (H) 137 de la secuencia de la α -sarcina y están incluidos en las zonas de coincidencia Glu 96-Phe 97-Pro 98, Arg 121-Tyr 122-Ile 123. El significado de estos resultados, será discutido mas adelante en la discusión general (apartado 4.6.).

3.8. Anticuerpos monoclonales

3.8.1. Características de los anticuerpos monoclonales (AcMos)

Las características más destacadas de los anticuerpos monoclonales utilizados quedan recogidas en el apartado 2.1. y en las tablas 2.3 a 2.5. Todos ellos, excepto MBr 1 y MoV 2, son inmunoglobulinas de clase IgG, MLuC2, MoV 17, MoV 18 y MINT5 presentan isotipo IgG1 y MLuC1 y MoV 19 isotipo IgG2a. MBr1 y MoV 2 son anticuerpos monoclonales de clase IgM.

Estos anticuerpos reconocen antígenos expresados en la superficie de las distintas líneas celulares (12,24,265,266,276,414,415,416). Así MBr 1 y MLuC1 reconocen como epítipo a hidratos de carbono presentes en distintos glicolípidos y glicoproteínas, MLuC2 y MoV 17, MoV 18 y MoV 19 reconocen distintos epítipos de glicoproteínas de membrana que un peso molecular de 75.000 y 38.000, respectivamente (265,266,276,414,415) (ver tabla 2.5.). Por último, MINT5 reconoce un epítipo de la glicoproteína de 120.000 de peso molecular, que actúa como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (416). Esta glicoproteína presenta niveles de expresión muy elevados en algunas líneas tumorales con

Fig. 3.57. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la α -sarcina con distintas ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico

En la figura aparecen numerados de 10 en 10 los aminoácidos de α -sarcina y marcados con (●) los de las demás ribonucleasas. Los datos mas relevantes sobre las proteínas se recogen en la tabla 2.8. Con una flecha se señalan los residuos que componen el centro activo de la ribonucleasa I1 de *Aspergillus oryzae* y otras ribonucleasas relacionadas con ella (255,256). Los residuos homólogos para el mayor número de las proteínas aparecen incluidos en cajas. La relación de homologías entre los distintos aminoácidos consideradas han sido: T = S, Y = F, G = A = V, V = L = I, D = N = E = Q (255). El procedimiento seguido se recoge en el apartado 2.12.

α-Sar 10 20
 U2 A V T W T C L N D Q K N P K - T M K Y E T K R L L Y M D - M
 MS C - - - - W I P E S T N C G G N - - - V Y S H - D
 C2 E S C E Y T C G S T - - - C Y W S - S
 Pbi D C D Y T C G S H - - - C Y S A - S
 T1 A C A A T C G T V - - - C Y T S - S
 St A C D Y T C G S M - - - C Y S S - S
 Sa O A P C G D T S - - - G F E D V R
 Bi D V S G T - V C - - - L S A L P P
 Ba A V I N T F D G V A - - - - D Y L I R Y K R L P N - - - D Y I T K S
 A D V I N T F D G V A - - - - D Y L Q T Y H K L P N - - - D Y I T K S

30 40 50
 α-Sar K A E S - - - - M S H H A P L S D - G K T - - - G S S Y P H W F T N G Y
 U2 D I N T - - - - A I Q - G A L D D V A R P - D - G D N Y P H Q Y - - - Y
 MS D V S A - - A K A K G - Y S L Y E S G D T - I - - D D Y P H E Y - - - H
 C2 A V S D - - A Q S A G - Y Q L Q S A G Q S - V G R S R Y P H Q Y - - - R
 Pbi A I S S - - A Q A A G - Y N L Y S T N D D - V - - S N Y P H E Y - - - H
 T1 D V S T - - A Q A A G - Y Q L H E D G E T - V G S N S Y P H K Y - - - M
 St L A D L P P E A T D T - Y E L I E K G G P - Y P Y P E D G T V F - - - E
 Sa E A R D T - - L - - - - N L I A S D G P F P - Y S D D G V V F - - - D
 Bi Q A S A L G W V A S K - G D L A E V A - P - G - K S I G G D V F - - - S
 Ba E A Q A L G W V A S K - G N L A D V A - P - G - K S I G G D I F - - - S

60 70 80 90
 α-Sar D - G D G K L P K G R T P I K F G K S D C D R P P K H S K D G N G K T D
 U2 D - E A S D - - - - - O I T L C - - - C G - P G S W S - - - - -
 MS D Y E G F N - - - - - F P V G I - - - - - S Y Y - - - - -
 C2 A Y E G F N - - - - - F P V S G - - - - - N Y Y - - - - -
 Pbi N Y E G F D - - - - - F P V S G - - - - - T Y Y - - - - -
 T1 N Y E G F D - - - - - F S V S S - - - - - D Y Y - - - - -
 St N R E G I L - - - - - P D C R E - - - - - G Y Y H - - - - -
 Sa N R E S V L - - - - - P T Q S Y - - - - - G Y Y H - - - - -
 Bi N R E G R L - - - - - P S A G S - - - - - R T W R - - - - -
 Ba N R E G K L - - - - - P G K S G - - - - - R T W R - - - - -

100 110 120
 α-Sar H Y L L E F P - T F P D G H D Y K F - D S K K P K E N P G P A R V I Y -
 U2 - - - - E F P L V Y - N G P - Y - Y - S S R D N Y V S P G P D R V I Y Q
 MS - - - - E Y P I M S - D Y D - V - Y - T G - - - - G S P G A D R V I F D
 C2 - - - - E W P I L S - S G S - T - Y - N G - - - - G G P G A D R V V F N
 Pbi - - - - E F P I L K - S C K - V - Y - T G - - - - S S P G A D R V I F N
 T1 - - - - E W P I L S - S G D - V - Y - S G - - - - P G S G A D R V V F N
 St - - - - E Y T V - - - - K - T - P - S G - - - - D D R G A R R F V V G
 Sa - - - - E Y T V - - - - I - T - P G - A - - - - R - T R G T R R I I C G
 Bi - - - - E A D I - - - - N - Y - V - S G - - - - F - - R N A D R L V Y S
 Ba - - - - E A D I - - - - N - Y - T - S G - - - - F - - R N S D R I L Y S

130 140 150
 α-Sar T - Y P N K V F C G I I A M T K E N - - Q G E L K L C S H
 U2 T - M T G E - F C A T V T M T G A R S Y D G - F T D C S
 MS G - D D - E - L A G V I T H T G A A G G D D - F V A C S S S
 C2 D - M D - G - L A G L I T H T G A - S G D G - F V A C Y
 Pbi D - D D - E - L A G V I T H T G A - S G N M - F V A C T
 T1 E - M N - Q - L A G V I T H T G A - S G N M - F V E C T
 St D - G G - E - Y F Y T E D H Y E - - - - S - F R L T I V N
 Sa E A T D - E - D Y Y T G D H Y A - - - - T - F S L I D O T C
 Bi S - D W - L - I Y K T T D H Y A - - - - T - F T R I R
 Ba S - D W - L - I Y K T T D H Y Q - - - - T - F T K I R

α -Sarcina	A	V	T	W	T	C	L	N	D	Q	K	N	P	K	T	N	K	Y	E	T	K	R	L	L	Y	N	Q	N	K	A
Mitogillina	A	-	T	W	T	C	I	N	Q	Q	L	N	P	K	T	N	K	W	E	D	K	R	L	L	Y	N	Q	A	K	A
Restrictocina	A	-	T	W	T	C	I	N	Q	Q	L	N	P	K	T	N	K	W	E	D	K	R	L	L	Y	S	Q	A	K	A

α -Sarcina	E	S	N	S	H	H	A	P	L	S	D	G	K	T	G	S	S	Y	P	H	W	F	T	N	G	Y	D	G	D	G
Mitogillina	E	S	N	S	H	H	A	P	L	S	D	G	K	T	G	S	S	Y	P	H	W	F	T	N	G	Y	D	G	N	G
Restrictocina	E	S	N	S	H	H	A	P	L	S	D	G	K	T	G	S	S	Y	P	H	W	F	T	N	G	Y	D	G	N	G

α -Sarcina	K	L	P	K	G	R	T	P	I	K	F	G	K	S	D	C	D	R	P	P	K	H	S	K	D	G	N	G	K	T
Mitogillina	K	L	I	K	G	R	T	P	I	K	F	G	K	A	D	C	D	R	P	P	K	H	S	Q	N	G	M	G	K	D
Restrictocina	K	L	I	K	G	R	T	P	I	K	F	G	K	A	D	C	D	R	P	P	K	H	S	Q	N	G	M	G	K	D

α -Sarcina	D	H	Y	L	L	E	F	P	T	F	P	D	G	H	D	Y	K	F	D	S	K	K	P	K	E	N	P	G	P	A
Mitogillina	D	H	Y	L	L	E	F	P	T	F	P	D	G	H	D	Y	K	F	D	S	K	K	P	K	E	N	P	G	P	A
Restrictocina	D	H	Y	L	L	E	F	P	T	F	P	D	G	H	D	Y	K	F	D	S	K	K	P	K	E	N	P	G	P	A

α -Sarcina	R	V	I	Y	T	Y	P	N	K	V	F	C	G	I	I	A	H	T	K	E	N	D	G	E	L	K	L	C	S	H
Mitogillina	R	V	I	Y	T	Y	P	N	K	V	F	C	G	I	V	A	H	Q	R	G	N	D	G	D	L	R	L	C	S	H
Restrictocina	R	V	I	Y	T	Y	P	N	K	V	F	C	G	I	V	A	H	Q	R	G	N	D	G	D	L	R	L	C	S	H

Fig. 3.58. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las aspergilas.

En la figura aparecen numerados de 10 en 10 los aminoácidos de α -sarcina. Con una flecha de doble punta se señalan los aminoácidos distintos entre la α -sarcina y las otras dos toxinas y con dos flechas de doble punta el único aminoácido distinto entre la mitogillina y la restrictocina. Con una flecha se señalan los residuos de la α -sarcina que se corresponden con los que componen el centro activo de la ribonucleasa T1 de *Aspergillus oryzae* y otras ribonucleasas relacionadas con ella (255,256). Los residuos homólogos entre las aspergilas y las demás ribonucleasas (ver fig. 3.57) aparecen incluidos en cajas.

respecto a las células normales, como es el caso de A 431, que presenta hasta 1.3×10^{-6} receptores por célula para el EGF murino (416).

La caracterización bioquímica y la determinación de la especificidad de los AcMos ha sido realizada en estudios anteriores, en este trabajo se analizó su capacidad de interacción con las distintas líneas celulares, su capacidad de internalización en las células diana y las posibles modificaciones sufridas tras la reacción con los agentes bifuncionales.

3.8.2. Estudio de la unión de los anticuerpos monoclonales a sus células diana e internalización

La unión de los anticuerpos monoclonales a sus células diana se estudió según el método descrito Matzku y col (294) cuyo procedimiento queda recogido en el apartado 2.10.2.1.. El método se realizó sobre las células tumorales incubadas con alícuotas de los AcMos marcados con ^{125}I . Los resultados obtenidos permitieron cuantificar el porcentaje de anticuerpo internalizado por la célula diana tras la interacción con sus correspondientes antígenos de superficie.

En las figuras 3.59. a 3.61., se recogen algunas de los resultados obtenidos. En las gráficas se representan los porcentajes de fijación de las muestras de los anticuerpos monoclonales marcados a las células en cultivo con respecto al tiempo de incubación, antes y después del tratamiento a pH 2.8, considerando como 100% el total de la radiactividad añadida en cada pocillo.

En la figura 3.59., aparecen los resultados obtenidos para la muestra de ^{125}I -MoV 17 sobre células vivas (figura 3.59. A) y células fijadas con glutaraldehído (figura 3.59. B) del carcinoma mamario OvCa 432. Como puede observarse en la figura A, un 40% de la radiactividad añadida se fija a las células cuando estas son incubadas a 37°C durante 120 minutos, mientras que a 0°C , se fija sólo un 14%.

Cuando tras la fijación del AcMo a las células, éstas son tratadas con un tampón a pH 2.8, casi el total de la radiactividad unida a 0°C se desprende de las células, mientras que sólo lo hace la mitad del AcMo marcado unido a 37°C (permanece unido un 20% tras la incubación a pH 2.8 frente a un 40% a pH 7.4). La diferencia entre ambos valores es lo que se consideró como porcentaje de unión y puede ser considerado equiparable a porcentaje de internalización.

En los experimentos realizados con las células fijadas con glutaraldehído (fig.3.59. B), la radiactividad unida a 0°C y a 37°C , se libera cuando las células son tratadas a pH 2.8, lo que indica que la interacción del anticuerpo monoclonal sólo tiene lugar en la superficie de la célula. A dicha temperatura, la cinética de los mecanismos de internalización de moléculas son mucho mas lentos, o incluso no se dan (294).

En las gráficas 3.60. y 3.61., se recogen los resultados obtenidos para Mov 18 en OvCa 432 (figura 3.60.), para MBr 1 en

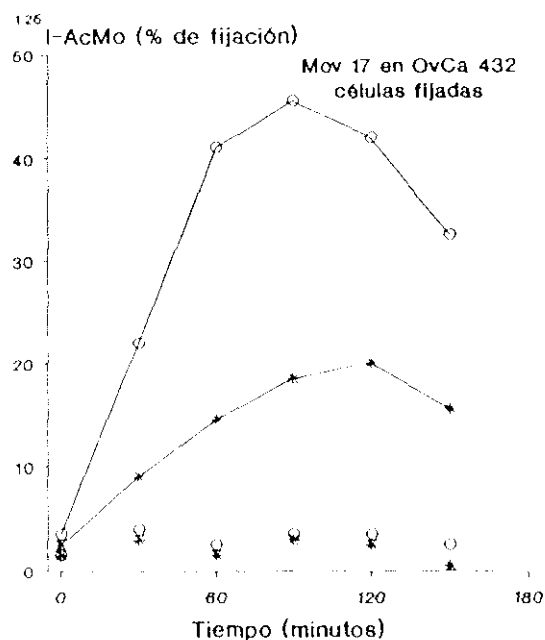
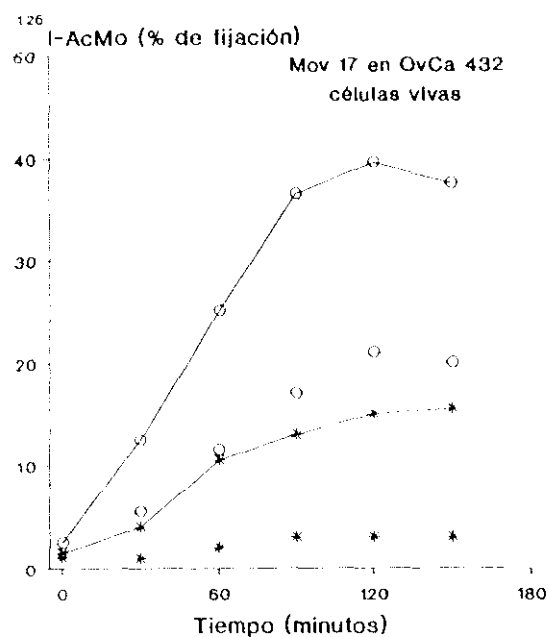


Fig. 3.59. Análisis de la internalización inducida por Mov 17 en células de OvCa 432.

A) Porcentaje de la radiactividad total unida a células vivas de OvCa 432, cuando se incuban con una muestra de ^{125}I -Mov 17 a los tiempos indicados y B) porcentaje de radiactividad total unida a células de OvCa 432 fijadas a placas con glutaraldehído, en las mismas condiciones. (○-○) unión total a 37°C (○- - ○) unión residual a 37°C, (*-*) unión total a 0°C y (*- - *) unión residual a 0°C. Como unión residual se entiende el porcentaje de unión obtenido cuando las células son tratadas con pH 2.8. El método se describe en el apartado 2.10.2.1.

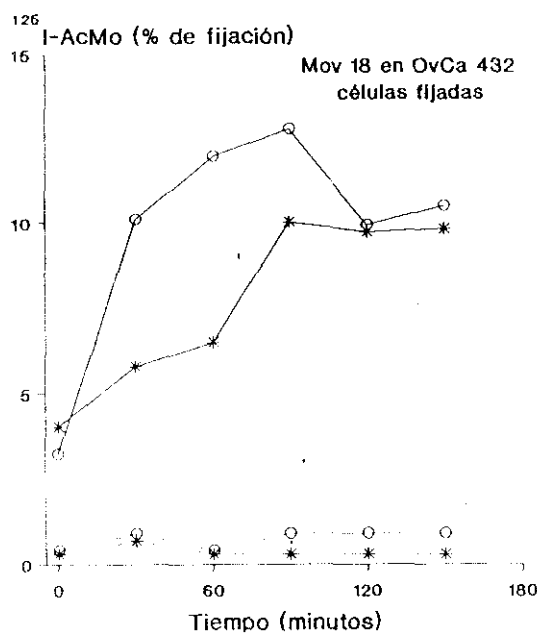
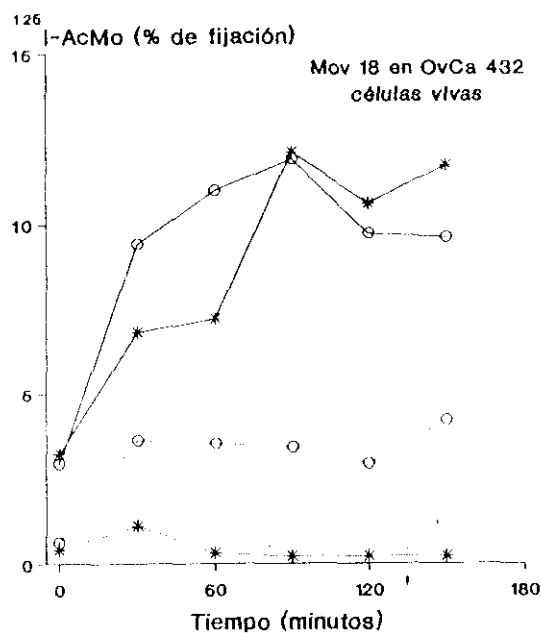


Fig. 3.60. Análisis de la internalización inducida por MoV 18 en células de OvCa 432.

A) Porcentaje de la radiactividad total unida a células vivas de OvCa 432, cuando se incuban con una muestra de ¹²⁵I-Mov 18 a los tiempos indicados y B) porcentaje de radiactividad total unida a células de OvCa 432 fijadas a placas con glutaraldehído, en las mismas condiciones. (○-○) unión total a 37°C (○-○) unión residual a 37°C, (*-*) unión total a 0°C y (*-*) unión residual a 0°C. Como unión residual se entiende el porcentaje de unión obtenido cuando las células son tratadas con pH 2.8. El método se describe en el apartado 2.10.2.f.

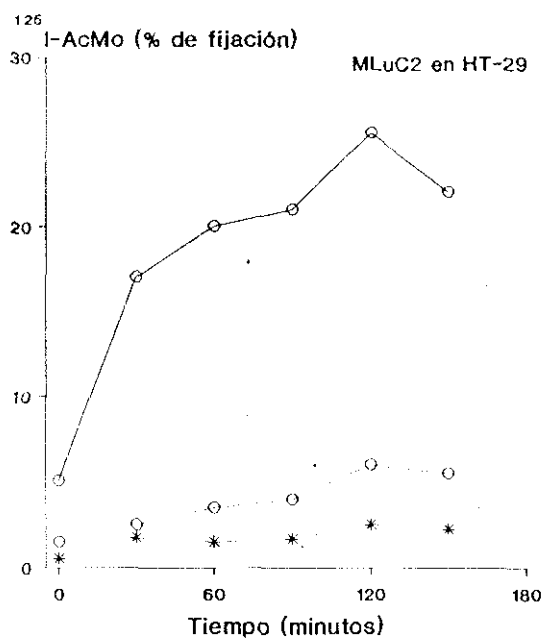
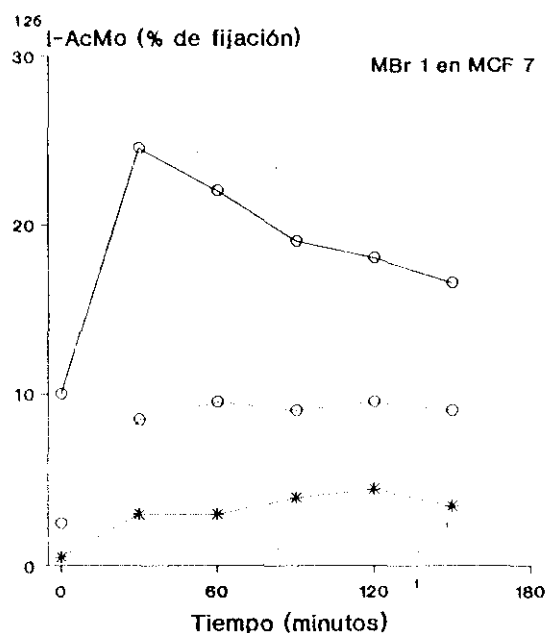


Fig. 3.61. Análisis de la internalización inducida por MBr1 en MCF7 (A) y por MLuC2 en HT-29 (B).

En las gráficas se representan los porcentajes de la radiactividad total unidos a células vivas y fijadas, incubadas con alícuotas de los anticuerpos monoclonales marcados con ¹²⁵I a los tiempos de indicados. (○-○) unión total, (○---○) unión residual y (*---*) unión residual en células fijadas. Como unión residual se entiende el porcentaje de unión obtenido cuando las células son tratadas con pH 2.8. El método se describe en el apartado 2.10.2.1.

MCF 7 (figura 3.61. A) y para MLC2 en HT 29 (figura 3.61. B) que pueden ser interpretados de forma similar. Los valores obtenidos sobre células fijadas en estos dos últimos experimentos no han sido representados ya que son comparables a los obtenidos en las gráficas anteriores.

Los estudios de unión de los anticuerpos MBr 1 en MCF 7 (fig. 3.61. A) y MLC2 en HT-29 (fig. 3.61. B), permitieron diferenciar dos cinéticas distintas en el proceso de internalización de los anticuerpos monoclonales, ya descrita por Matzku. MBr1, presenta una cinética de unión rápida a MCF7, ya que se observan los mayores niveles después de 30 minutos de incubación (un 26% del total de la radiactividad), este porcentaje disminuye hasta el final del experimento en que se sitúa por debajo del 20%. MLC2 presentaría, por el contrario, una cinética de unión lenta sobre HT-29, ya que los porcentajes de unión aumentan con el tiempo de incubación, siendo máximos a los 150 minutos.

A partir de estas gráficas, se estimaron los porcentajes de unión de los anticuerpos monoclonales a sus correspondientes células diana, que se recogen en la tabla 3.16. Estos resultados fueron comparados con los datos de internalización de los AcMos, obtenidos por Mezzanzanica y col (293) en experimentos de microscopía electrónica utilizando muestras marcadas con biotina y partículas de oro coloidal marcadas con avidina.

Como puede observarse, en la mayoría de los casos es posible establecer una correlación entre el porcentaje de unión observado para cada AcMo y los datos de internalización obtenidos por microscopía electrónica. Así, los anticuerpos monoclonales que muestran un porcentaje de unión superior al 25% han presentado, a su vez, una internalización evidente. La única excepción la supuso el resultado obtenido con MoV 17 sobre la línea celular HT-29, para el que se obtiene un porcentaje de unión de un 60% y solo se observó una internalización ocasional.

Por otro lado, los anticuerpos para los que no había sido comprobada la internalización por microscopía electrónica, no se unen a la membrana o lo hacen en muy baja proporción.

Como pudo comprobarse más adelante, la evidencia de no internalización de los anticuerpos fue uno de los factores limitantes para la actividad de las inmunotoxinas sintetizadas con las aspergilinas. Así, el conjugado realizado con MLC2 y la restrictocina, no resultó activo en HT-29, ya que MLC2 no es capaz de internalizar en esta línea celular.

Por otro lado, puede observarse que los anticuerpos monoclonales presentan un comportamiento muy distintos frente a sus células dianas. El porcentaje de unión permite valorar el número de moléculas de antígeno en la superficie celular así como estimar, de forma indirecta, la capacidad de la célula para internalizar los complejos antígeno-anticuerpo (289,293). Estos parámetros permiten predecir, por tanto, la actividad de las inmunotoxinas.

Tabla 3.16.

anticuerpo monoclonal	célula diana	porcentaje de unión (%)	internalización
MBr 1	MCF 7	28	evidente
Mov 17	OvCa 432	48	evidente
	MCF 7	42	evidente
	HT-29	60	ocasional
Mov 18	OvCa 432	38	ocasional
Mov 19	OvCa 432	17	no internaliza
	IGROV 1	0	no internaliza
MLuO1	SW 626	37	evidente
	MCF 7	53	evidente
MLuO2	HT-29	14	no internaliza
MINT-5	A 431	30	evidente

Tabla 3.16. Porcentajes de unión de los anticuerpos monoclonales a sus correspondientes líneas celulares

En la tabla se recogen los porcentajes de unión de los anticuerpos monoclonales a sus células diana, según el método de Matzku y col (294), que se describe en el apartado 2.10.2.1. y a partir de gráficas similares a las que aparecen en las figuras 3.59. a 3.61. Los datos sobre internalización de los anticuerpos han sido tomados de Mezzanzanica y col (293) en donde se estudió la entrada en células por inmunoelectromicroscopia usando anticuerpos monoclonales biotinilados y oro coloidal marcado con avidina.

3.8.3. Reacción de los anticuerpos monoclonales con agentes bifuncionales de unión

Las moléculas de IgG e IgM carecen de grupos sulfhidrilo libres, ya que todas las cadenas laterales de las cisteínas se encuentra formando puentes disulfuro entre si (298). La introducción de estos radicales se hace a través de la reacción de los AcMos con agentes químicos bifuncionales, tal y como ha sido anteriormente para las aspergilinas (189,333).

En este caso, los AcMos se hicieron reaccionar con distintas cantidades de SPDP y SMPT que fueron los agentes elegidos para llevar a cabo la conjugación con las toxinas y, tras la reacción se determinó, en cada caso, el número de grupos PDP o MPT incorporados por molécula de anticuerpo, expresado como relación de sustitución molar. También se determinó el porcentaje de pérdida de actividad de fijación a células.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.17., en donde puede observarse que la relación de sustitución molar está en función del número de veces de exceso molar de SPDP con que se hizo reaccionar cada uno de los anticuerpos monoclonales. Así, cuando se utilizaron valores de 30 veces exceso molar de SPDP, el número de grupos PDP incorporados osciló entre 8 y 10, mientras que con un 10 veces de exceso molar estuvo entre 3.3 y 5 grupos.

En el caso de SMPT (336), la relación de grupos MPT incorporados por molécula de MINT-5, anticuerpo monoclonal de clase IgG, es de 1.9 cuando se utiliza una proporción de 3 veces exceso molar.

Las fracciones derivadas de la reacción con ambos agentes, denominadas AcMo-PDP y AcMo-MPT fueron estudiados conjuntamente con las moléculas de anticuerpo nativo y con las inmunotoxinas, ya que el excesivo grado de sustitución de los anticuerpos monoclonales afecta, fundamentalmente, a la capacidad de los conjugados para interaccionar con la superficie de las células tumorales que expresan el antígeno reconocido. Estos resultados serán analizados más adelante, en los apartados 3.9.2.1. y 3.9.2.2.

La primera valoración que puede hacerse de los resultados obtenidos cuando se utiliza SPDP con agente bifuncional, es que los anticuerpos monoclonales de clase IgG con más de 5 grupos PDP por moléculas fueron en los que se observaron las mayores alteraciones. Por un lado, los anticuerpos presentaron un mayor porcentaje de interacciones inespecíficas con la superficie celular debido a la reactividad de los grupos SH según había sido confirmado por Dosio y col (333), por otro lado, cuando MoV 18 y MoV 19 fueron conjugados con la restrictocina, la actividad de unión de las inmunotoxinas se vió reducida hasta valores próximos al 50% (66% para MoV 18-restrictocina y 48% para MoV 17-restrictocina, según se recoge en la tabla 3.18). Estas inmunotoxinas eran, por otro lado las que contenían mayor número de moléculas de toxinas.

Los demás anticuerpos no sufrieron modificaciones significativas, ya que su capacidad de unión a las células (figuras 3.66. a 3.68. y 3.70.) no se redujo significativamente y no se alteró

Tabla 3.17.

anticuerpo monoclonal	isotipo	exceso molar ¹	relación entre:	
			PDP/MAb	MPT/MAb
MBr 1	IgM	30	9	
MLuCl	IgG2a	10	4	
MLuCl2	IgG1	10	5	
Mov 17 ²	IgG1	30	10	
		10	3.3	
Mov 18	IgG1	30	10	
Mov 19	IgG2a	30	8	
MINT-5	IgG1	3		1.9

Tabla 3.17. Cálculo del número de grupos reactivos incorporados por molécula de anticuerpo monoclonal tras la reacción con agentes bifuncionales

En la tabla se recorre el número de grupos PDP o MPT incorporados por molécula de anticuerpo monoclonal, tras la reacción con los agentes SPDP y SMPT, respectivamente según se describe en el apartado 2.7.3. La relación molar se determinó por la medida de los grupos liberados tras la reducción por absorbancia a 343 nm como se describe en el apartado 2.7.4.

¹⁾ Como tal se indica el número de veces exceso molar de SPDP y SMPT (para el anticuerpo MINT-5) con respecto a la concentración de anticuerpo monoclonal.

²⁾ El anticuerpo monoclonal Mov 17 se hizo reaccionar con 30 veces de exceso molar SPDP cuando se conjugó con la restrictocina y con 10 veces de exceso molar cuando se unió a la α -sarcina.

su movilidad cuando se sometieron a electroforesis geles de poliacrilamida (figuras 3.62. a 3.65.). Tampoco se observaron variaciones significativas en la actividad de MBr 1, que es una IgM.

En general, puede considerarse que una razón molar de 9 grupos PDP en los AcMos de clase IgM y de 5 grupos PDP para las IgG son los valores más adecuadas para mantener la actividad de los anticuerpos.

El número de datos de que se dispone sobre la reacción con SMPT es menor, ya que este agente solo ha sido utilizado con el AcMo MINT-5. Sin embargo, la relación de sustitución molar obtenida de aproximadamente 2 grupos MPT por molécula de MINT-5 se consideró la adecuada en comparación con los datos obtenidos por otros autores (336).

Durante el proceso de obtención del conjugado MINT-5- α -sarcina, la fracción sometida a reducción antes de la conjugación fue la fracción de MINT-5-MPT. Esta reducción da origen a la formación de agregados de alto peso molecular formados por dos o más moléculas de anticuerpo monoclonal unidas a través de puentes S-S. Este efecto se hizo patente en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), cuyo resultado queda recogido en las figuras 3.64. B y 3.65 B.

3.9. Inmunotoxinas

3.9.1. Caracterización de las inmunotoxinas sintetizadas con las aspergilinas

Una vez estudiadas las características de las toxinas y de los anticuerpos monoclonales, y tras comprobar que la incorporación de grupos bifuncionales no modificaba drásticamente sus características bioquímicas y funcionales, se procedió a la obtención de inmunotoxinas con dos de las aspergilinas: la restrictocina y la α -sarcina.

Como ha sido descrito en materiales y métodos, en los casos en que la toxina y el AcMo, habían sido tratados con SPDP las moléculas de aspergilina-PDP eran reducidas con ditiotreitól (ver apartado 2.7.2.). Cuando se llevó a cabo la conjugación entre MINT-5-MPT y la α -sarcina-PDP, se redujo la muestra de anticuerpo (ver apartado 2.7.3.3.).

3.9.1.1. Purificación de las inmunotoxinas

Las reacciones de conjugación entre las moléculas de AcMo-PDP y de aspergilina-SH se llevaron a cabo según se describe en los apartados 2.7.5.1. Cuando estas reacciones se dieron por finalizadas, las muestras se cargaron en una columna de AcA 44, equilibrada en tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.8. El perfil cromatográfico de elución de la columna para la muestra de MoV 17-restrictocina, se recoge en la figura 3.62. A.

Las distintas fracciones obtenidas en la cromatografía de

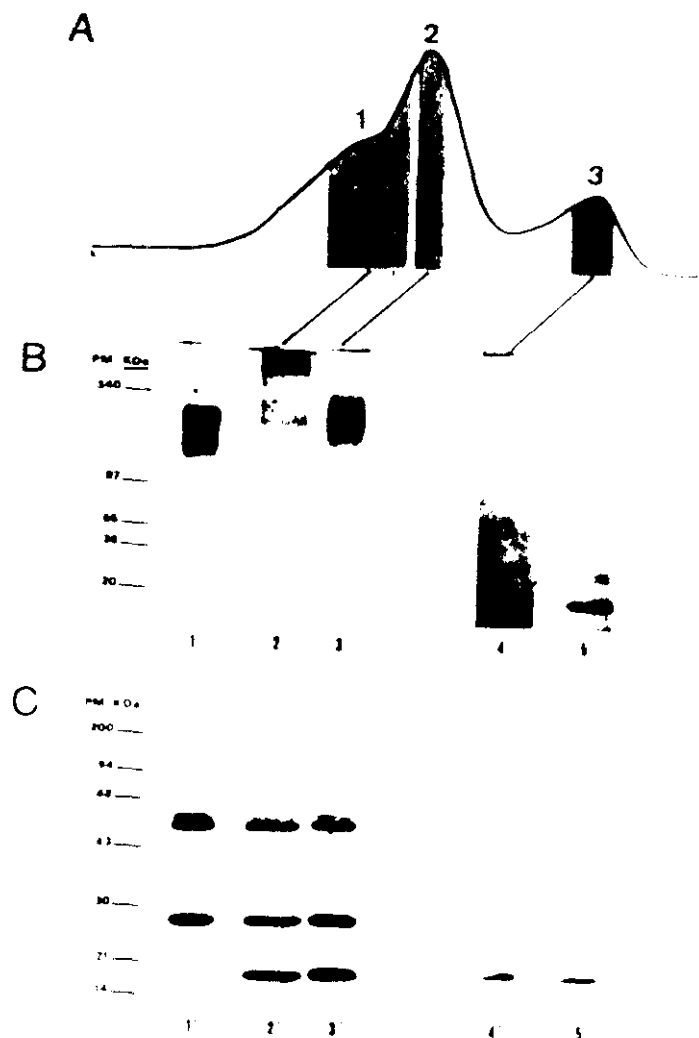


Fig. 3.62. Perfil cromatográfico y análisis en PAGE-SDS de las fracciones obtenidas de la filtración en Ultragel Aca 44 del producto de conjugación del anticuerpo MoV 17 con la restrictocina

Tras la reacción de conjugación, el material fue cargado en una columna de Ultragel Aca 44, equilibrada en tampón 0.01 M fosfato potásico pH 6.8 (apartado 2.7.5.1.). A partir del perfil de elución de la columna, representado en A), se recogieron tres grupos de fracciones, denominadas como picos [1], [2] y [3], que fueron analizadas en PAGE-SDS.

Las muestras se aplicaron, en primer lugar, en un gel en gradiente de entre un 5% p/v y un 15% p/v de acrilamida recogido en B) y, en segundo lugar, en un gel en gradiente de entre un 10% p/v y un 15% p/v de acrilamida, en condiciones reductoras (apartado 2.3.7.1.), recogido en C). El orden de aplicación de las muestras fue el siguiente: pocillos 1 y 1'), anticuerpo monoclonal MoV 17, pocillos 2 y 2'), pico [1] de Ultragel Aca 44, pocillos 3 y 3'), pico [2], pocillos 4 y 4'), pico [3] y pocillos 5 y 5') restrictocina.

En ambos geles de indica el peso molecular de las proteínas que fueron utilizadas como marcadores (PM-kDa) y su movilidad.

filtración de MoV 17-restrictocina fueron analizadas en PAGE-SDS en geles de poli(acrilamida) en condiciones no reductoras (Fig. 3.62. B) y en condiciones reductoras (Fig 3.62. C).

Como puede observarse, durante la reacción de conjugación parte del material obtenido presenta un peso molecular superior a 340.000 (pocillo 2) que eluye en primer lugar, junto con parte de las fracciones que contienen la inmunotoxina. Esta fracción está compuesta por moléculas de AcMo-PDP dimerizadas durante la reacción y contiene una porción importante de inmunotoxina, como puede comprobarse cuando es sometido a reducción. Bajo condiciones reductoras (pocillo 2'), esta fracción se distribuye en tres bandas de pesos moleculares que se corresponden con las cadenas pesada (50.000) y ligera (25.000) del anticuerpo y con la restrictocina (16.660) comparables a las obtenidas en el pocillo 1' que contiene una muestra reducida de MoV 17 y en el pocillo 5' que contiene una muestra de la restrictocina nativa.

Las fracciones señaladas como 2 de AcA 44, contienen mayoritariamente las moléculas de inmunotoxina (pocillo 3). Este material presenta un peso molecular superior al AcMo (pocillo 1) y, en condiciones reductoras, se distribuye en tres bandas equivalentes a las que se observan en el pocillo 2'. Por último, las fracciones que componen el pico denominado como 3, contienen sólo la porción de α -sarcina-SH no unida al anticuerpo monoclonal (pocillo 4 y 4') y presentan igual movilidad en PAGE-SDS que la muestra de restrictocina nativa tanto en condiciones reductoras como no reductoras (pocillos 5 y 5').

Un análisis similar de las inmunotoxinas MBr 1-restrictocina y MLuC1-restrictocina aparece recogido en la figura 3.63., en condiciones no reductoras (3.63. A) y reductoras (3.63. B).

En la figura 3.63. A, puede observarse como la banda correspondiente a la proteína nativa (pocillo G), que aparece en los pocillos que contiene el material obtenido tras la reacción de conjugación (pocillos B y E) desaparece tras la filtración en AcA 44 (pocillos C y F).

En los pocillos E y F, se aprecia la diferencia de peso molecular entre el conjugado MLuC1-restrictocina y el AcMo nativo (pocillo D). También se observa como ni las moléculas de anticuerpo MBr 1 (pocillo A) ni las inmunotoxinas (pocillos B y C) penetran en el gel, ya que se trata de una IgM.

Cuando el gel se realizó en condiciones reductoras, las muestras que contienen AcMo (pocillos a a f) presentan bandas que corresponden con sus dos cadenas. En los pocillos b,c,e y f aparece, además, una banda de peso molecular equivalente a la restrictocina, tanto en las muestras que se corresponden con la mezcla de reacción (pocillos b y e), como en las que se aplican las fracciones obtenidas en AcA 44 (pocillos c y d). Estas bandas de restrictocina son de distinta intensidad ya que la cantidad de proteína de los pocillos b y e, se corresponde con la muestra añadida a la reacción mientras que, en los pocillos c y f, sólo representa el porcentaje de proteína unida al anticuerpo.

Los resultados recogidos en estos geles, en los que se utilizaron como referencia muestras de los anticuerpos monoclonales

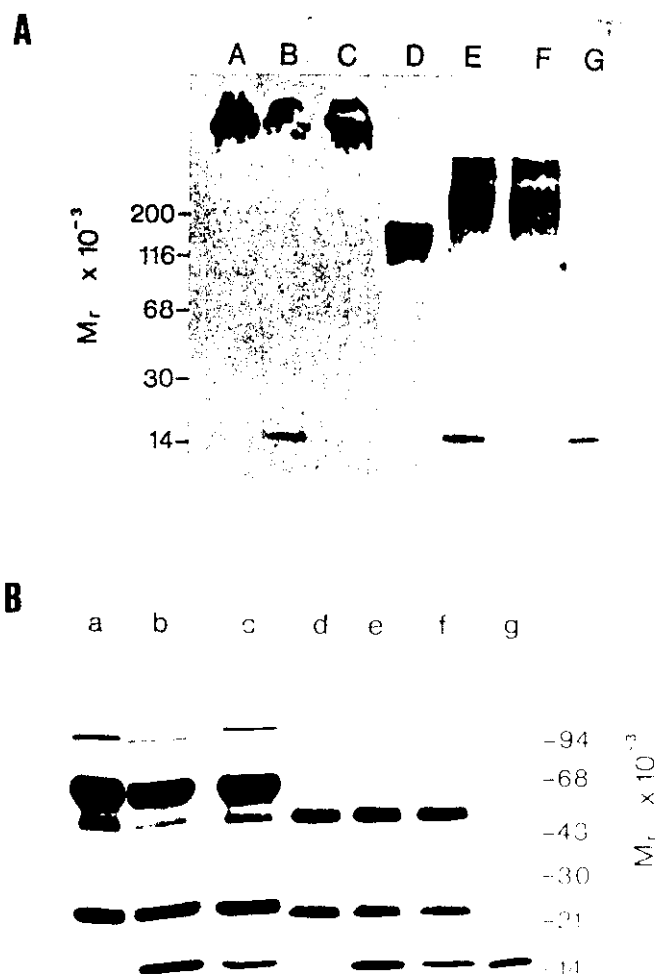


Fig. 3.63. Análisis en PAGE-SDS de las fracciones obtenidas a lo largo del proceso de conjugación de los anticuerpos MBr 1 y MLuCl1 con la restrictocina

Las distintas fracciones obtenidas a lo largo del proceso de conjugación y de purificación (apartado 2.7.5.1.) fueron analizadas, en primer lugar, en un gel en gradiente de entre un 5% p/v de acrilamida, recogido en A (pocillos A-G) y, en segundo lugar, en un gel en gradiente de entre un 10% p/v y un 15% p/v de acrilamida, en condiciones reductoras (apartado 2.3.7.1.) recogido en B (pocillos a-g). Las muestras aplicadas fueron las siguientes: pocillos A y a). anticuerpo MBr 1 (IgM), pocillos B y b). material de la mezcla de conjugación entre MBr 1 y restrictocina, pocillos C y c). MBr 1-restrictocina, tras la filtración en Ultrogel AcA 44, pocillos D y d). anticuerpo MLuCl1, pocillos E y e). material de la mezcla de conjugación entre MLuCl1 y restrictocina, pocillos F y f). MLuCl1-restrictocina tras la filtración en Ultrogel AcA 44 y pocillos G y g). muestras de restrictocina. En los dos geles se indica el peso molecular de las proteínas utilizadas como marcadores ($M_r \times 10^{-3}$) y su movilidad.

les nativos y restrictocina nativa permiten confirmar que durante el proceso de conjugación, no se observan cambios en la movilidad de las moléculas.

3.9.1.2. Purificación del conjugado MINT-5- α -sarcina

El anticuerpo monoclonal MINT-5, que reconoce un epitopo de la proteína de membrana que actúa como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (416), fue conjugada con la α -sarcina. Para llevar a cabo esta conjugación, se eligió el SMPT como agente bifuncional, ya que da origen a un puente disulfuro protegido del ataque de compuestos reductores.

En primer lugar, según se recoge en la figura 3.64. B, pudo observarse que la muestras de MINT-5-MPT (pocillo 2), al igual que ocurre con los AcMos que se hacen reaccionar con SPDP, no ve alterada su movilidad tras la reacción con respecto al anticuerpo nativo (pocillo 1).

Los grupos MPT incorporados fueron reducidos previamente a la reacción de conjugación con la fracción α -sarcina-PDP, el material obtenido se analiza en el pocillo 3 de la figura 3.64. B. Como puede observarse, la reducción de los radicales SH de los grupos MPT, induce la dimerización de las moléculas de anticuerpo.

El producto de conjugación fue cargado en una columna de AcA 44, según se describe en el apartado 2.7.5.2. y cuyo perfil cromatográfico de elución queda recogido en la figura 3.64. A. De esta forma, fue posible separar la fracción de α -sarcina no unida al AcMo según se observa en el pocillo 3 de la figura 3.64. B.

Como ha sido referido anteriormente, las inmunotoxinas eluyen de AcA 44 en la misma fracción que AcMo no conjugado a la proteína, ya que las diferencias de peso molecular entre ambas moléculas no permite su resolución en la columna de filtración. Este hecho hace que la actividad de las inmunotoxinas se vea enmascarada ya que el AcMo libre compite en la unión con los antígenos de la superficie celular (359).

Se llevaron a cabo distintos intentos de purificación de las inmunotoxinas utilizando colorantes triazínicos inmovilizados en distintas matrices, como la Blue-Sepharose o el Affi-Gel Blue (359,412). Pero, tras los estudios realizados sobre la interacción de las aspergilinas con Cibacron blue, en los que se comprobó que las proteínas no quedaban retenidas de forma mayoritaria, hizo necesario recurrir a otras técnicas cromatográficas.

Por tanto, el pico eluido de AcA 44 que contenía el conjugado MINT-5- α -sarcina (pico 1 de la figura 3.64. A), fue sometido a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna de hidroxilapatita. La columna se equilibró en tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.8 y el material retenido fue eluido con un gradiente de fuerza iónica entre 0 M y 0.35 M NaCl, en el tampón de equilibrado (ver apartado 2.7.5.2.).

El perfil cromatográfico obtenido en HCA-HPLC se recoge en

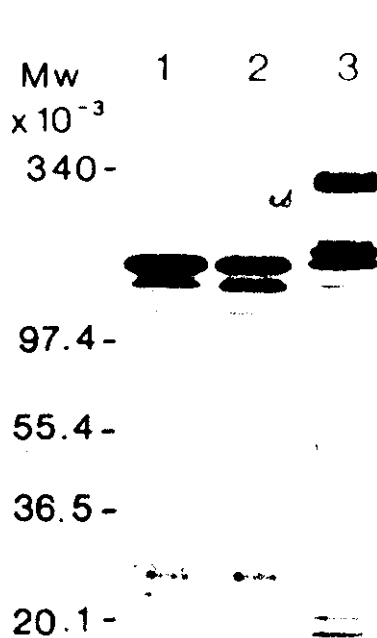
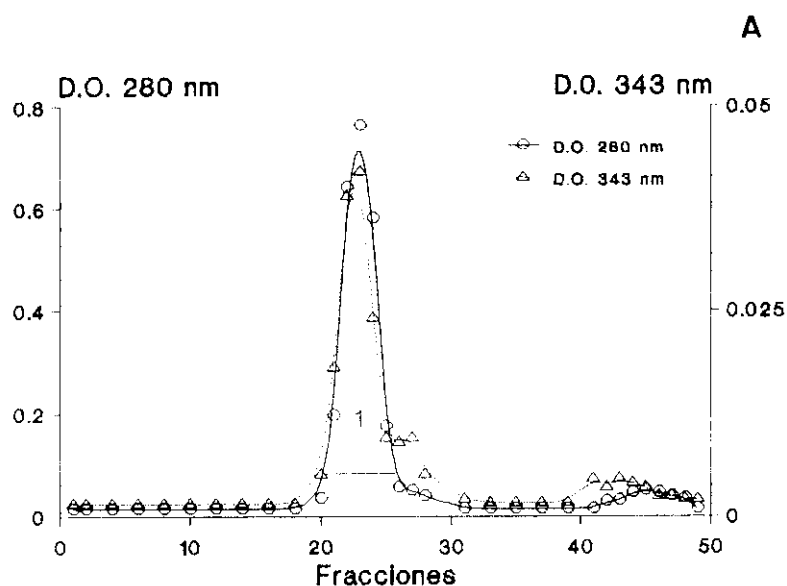


Fig. 3.64. Análisis en PAGE-SDS de componentes de la mezcla de reacción de conjugación de MINT-5 con la α -sarcina y filtración en ultrogel Aca 44 del producto de la reacción

A) En un gel en gradiente de poliacrilamida con una concentración de entre un 4% p/v y un 15% p/v de acrilamida, se aplicaron las siguientes muestras: pocillo 1) 3 μ g del anticuerpo monoclonal MINT-5 nativo, pocillo 2) 3 μ g de MINT-5 tras la reacción con SMPT (apartado 2.7.3.2.) y pocillo 3). 4 μ g del material obtenido tras la reacción de conjugación entre MINT-5-MPT y α -sarcina-PDP (apartado 2.7.5.2.). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema microprocesador automático Phastsystem (apartado 2.3.7.3.). En el gel se indican los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

B) El material de la reacción de conjugación fue aplicado en una columna de Ultrogel Aca 44, equilibrada en tampón 0.010 M fosfato sódico (ver apartado 2.3.7.3.) determinándose la densidad óptica a 280 nm y a 343 nm. El grupo de fracciones que constituyen el pico [1], fue recogido y aplicado en una columna de HCA-HPLC (ver figura 3.65.).

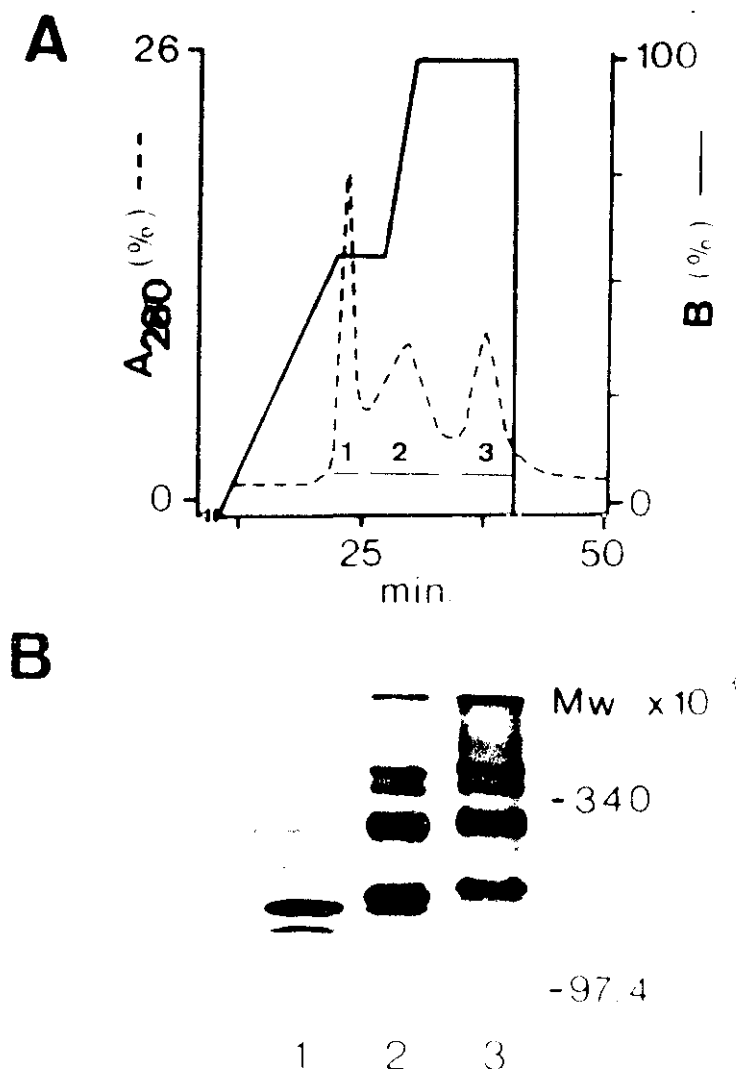


Fig. 3.65. Cromatografía de intercambio iónico en hidroxilapatita en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HCA-HPLC) del material eluido de Ultrogel Aca 44 y análisis en PAGE-SDS de los picos obtenidos

El pico [1] obtenido en la filtración en Ultrogel Aca 44 (figura 3.64.) del material de la reacción de conjugación entre MINT-5 y la α -sarcina fue aplicado a una columna de HCA-HPLC, equilibrada en tampón 0.010 M fosfato potásico, pH 6.8 (apartado 2.7.5.2.). La columna fue eluida con un gradiente de fuerza iónica entre 0.001 M y 0.350 M del mismo tampón de equilibrado (B (%)) y a partir del perfil de elución, representado en A), se recogieron tres grupos de fracciones o picos denominados como [1], [2] y [3].

B) El material de estos picos fue analizado en PAGE-SDS, utilizando un gel de poliacrilamida en gradiente con una concentración de acrilamida de entre un 4% p/v y un 15% p/v y que fue desarrollado en el sistema microprocesador automático Phastsystem (apartado 2.3.7.3.). En el gel se aplicaron 3 μ g del pico [1] y 6 μ g de los picos [2] y [3]. En el gel se indican los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como marcadores y su movilidad.

la figura 3.65. A y el análisis en PAGE-SDS en geles de gradiente de poliacrilamida, en la figura 3.65. 8. Las fracciones correspondiente con el pico 1 de la cromatografía, presentaron una banda de movilidad y peso molecular equivalentes al anticuerpo nativo (pocillo 1), mientras que las fracciones 2 y 3 contienen bandas de mayor peso molecular (pocillos 2 y 3, respectivamente), que se corresponden con la inmunotoxina y agregados de distinta naturaleza.

Las bandas correspondientes con la molécula de inmunotoxina de las fracciones 2 y 3, presentaron pesos moleculares ligeramente distintos. Aunque este hecho no ha sido completamente aclarado, puede estar en relación con el número de moléculas de toxinas unidas a MINT-5, de manera que, en la fracción 2, se encontrarían las inmunotoxinas que contienen una sola molécula de α -sarcina y, en la fracción 3, aquellas que contienen 2 moléculas por molécula de AcMo, ya que como se describe a continuación la relación toxina/AcMo obtenida por densitometría fue de 1.3.

3.9.1.3. Cálculo de las relaciones moleculares entre los componentes de las inmunotoxinas

La determinación del número de moléculas de toxina unidas por molécula de anticuerpo monoclonal, se realizó por estudio densitométrico de los geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), en condiciones reductoras, según se describe en el apartado 2.7.6., y los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.18.

En las inmunotoxinas realizadas con AcMo unido a PDP, en los que se utilizaron 5 veces exceso molar de aspergilina-PDP, el número de moléculas de toxina unidas por molécula de anticuerpo osciló entre 1.8 y 3.5.

En el caso de MINT-5-MPT, se observó una relación de 1.3 moléculas de α -sarcina por molécula de anticuerpo.

Tras la conjugación, se estudió comparativamente la actividad de unión de los AcMos a las líneas celulares, antes y después de la unión con las toxinas. Como puede observarse en la tabla, cinco de los conjugados presentaron niveles de unión muy elevados (igual o superior al 85%), en el conjugado MoV 17-restrictocina el anticuerpo mantiene un 70% de su capacidad para reconocer los antígenos expresados en la membrana celular, mientras que las inmunotoxinas MoV 18-restrictocina y MoV 19-restrictocina ven reducida su actividad por encima del 30% por lo que fueron descartados de experimentos posteriores. Estos dos últimos conjugados presentaban una relación toxina/AcMo igual o superior a 3.

Según estos resultados, es posible observar que la unión de un número excesivo de moléculas de toxina puede provocar la modificación de la afinidad de los AcMos, que no son capaces de reconocer con igual eficacia los antígenos contra los que han sido sintetizados. En este caso, generalmente, un número de moléculas de aspergilina superior a 2, puede dar lugar a la inactivación de la inmunotoxina.

Tabla 3.18.

conjugado	célula diana	toxina/MAb	actividad de unión (%)
restrictocina			
MBr 1-Res	MCF 7	2	100
MLuC1-Res	MCF 7	2.5	100
MLuC2-Res	HT-29	2	95
MoV 17-Res	OvCa 432	1.8	70
MoV 18-Res	OvCa 432	2.9	66
MoV 19-Res	OvCa 432	3.5	48
α-sarcina			
MoV 17-α-sar	OvCa 432	1.8	85
MINT-5-α-sar	A 431	1.3	85

Tabla 3.18. Características de las inmunotoxinas sintetizadas con las aspergilas

En la tabla se recogen algunas de las características de las inmunotoxinas sintetizadas con la restrictocina y con la α-sarcina (apartados 2.7.5.1. y 2.7.5.2.). En la tabla se especifica el conjugado (columna primera) y la célula diana correspondiente (segunda columna). La relación entre el número de moléculas de toxina conjugadas por molécula de anticuerpo monoclonal (tercera columna) se determinó por densitometría de los geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), según se describe en el apartado 2.7.6. El porcentaje de actividad de unión de cada conjugado a su célula diana (columna cuarta), se determinó por RIA en fase sólida (apartado 2.8.2.2.1.). Se consideró como 100% de unión, el número de cuentas por minuto unidas a la célula cuando estas se incuban en presencia del anticuerpo monoclonal. La unión de las inmunotoxinas sobre las células no diana, no excedió nunca del 20%.

3.9.2. Estudio de unión a células de las distintas fracciones de conjugación

3.9.2.1. Determinación de la especificidad de unión con la superficie de las líneas celulares

La alta especificidad de reconocimiento de las células tumorales que expresan un determinado antígeno es una de las ventajas más destacadas que presentan las inmunotoxinas (385). Por este motivo, fue necesario comprobar que los conjugados sintetizados mantienen la especificidad de unión sobre las células diana y no reconocen otras líneas celulares.

En las figuras 3.66. a 3.68., se representan las curvas de fijación a células de los AcMos, de las fracciones AcMo-PDP y de las inmunotoxinas derivadas de ellos. Estos experimentos han sido realizados incubando, en cada caso, células de las distintas líneas celulares diana y no diana con cantidades equivalentes de cada una de las tres fracciones, tras lo cual, los cultivos eran tratados con alícuotas radiactivas de un antisuero de cabra que reconoce el fragmento Fc de las cadenas pesadas de la IgG de ratón, denominado α -7S, y antisueros de conejos específicos contra las aspergilinas, según el procedimiento experimental de radioinmunoensayo que se recoge en el apartado 2.8.2.2.1.

En la primera figura (fig. 3.66.), se recogen los resultados obtenidos con las muestras de MBr 1, MBr 1-PDP y MBr 1-restrictocina sobre célula de la línea MCF 7, que expresa el antígeno reconocido por MBr 1, (figuras A y B) y sobre SW 626 que no lo expresa (figuras C y D).

Como puede observarse, las tres fracciones interaccionan con MCF 7 de forma específica, presentando niveles de unión equivalente (figura 3.66. A). Mientras que las curvas de unión de MBr 1 y MBr 1-restrictocina son prácticamente superponibles, la fracción MBr 1-PDP presenta aproximadamente un 10% de fijación inespecífica con las concentraciones mayores ensayadas (3750 ng/ml), que se refleja en el mayor número de cuentas por minutos fijadas de esta alícuota MCF 7 y en la unión a SW626 (figura 3.66. C). Esta interacción inespecífica ha sido relacionada con la alta reactividad que presentan los grupos SH con otros grupos presentes en la membrana celular (333).

La presencia de la restrictocina sobre la superficie celular de MCF 7 se puso de manifiesto cuando se utilizó un antisuero de conejo contra la mitogillina (figura 3.66. B). En este caso, la única fracción reconocida es la inmunotoxina, lo que demuestra que la molécula se mantiene estable en el medio de cultivo celular.

Los niveles de unión inespecífica de las tres fracciones con las células de SW 626 no superaron, en ningún caso, el 20% de la fijación a MCF 7. Iguales resultados se han obtenidos sobre otras líneas celulares, como se recoge en la figura 3.69, para una concentración de 7 mM de MBr 1 y para igual concentración de MBr 1-restrictocina. En esta figura se recogen también los valores de fijación sobre las distintas líneas celulares de la inmunotoxina MBr 1-RCA, sintetizada según se refiere en el apartado 2.7.5.3. y que fue caracterizada previamente por Canevari y col (332).

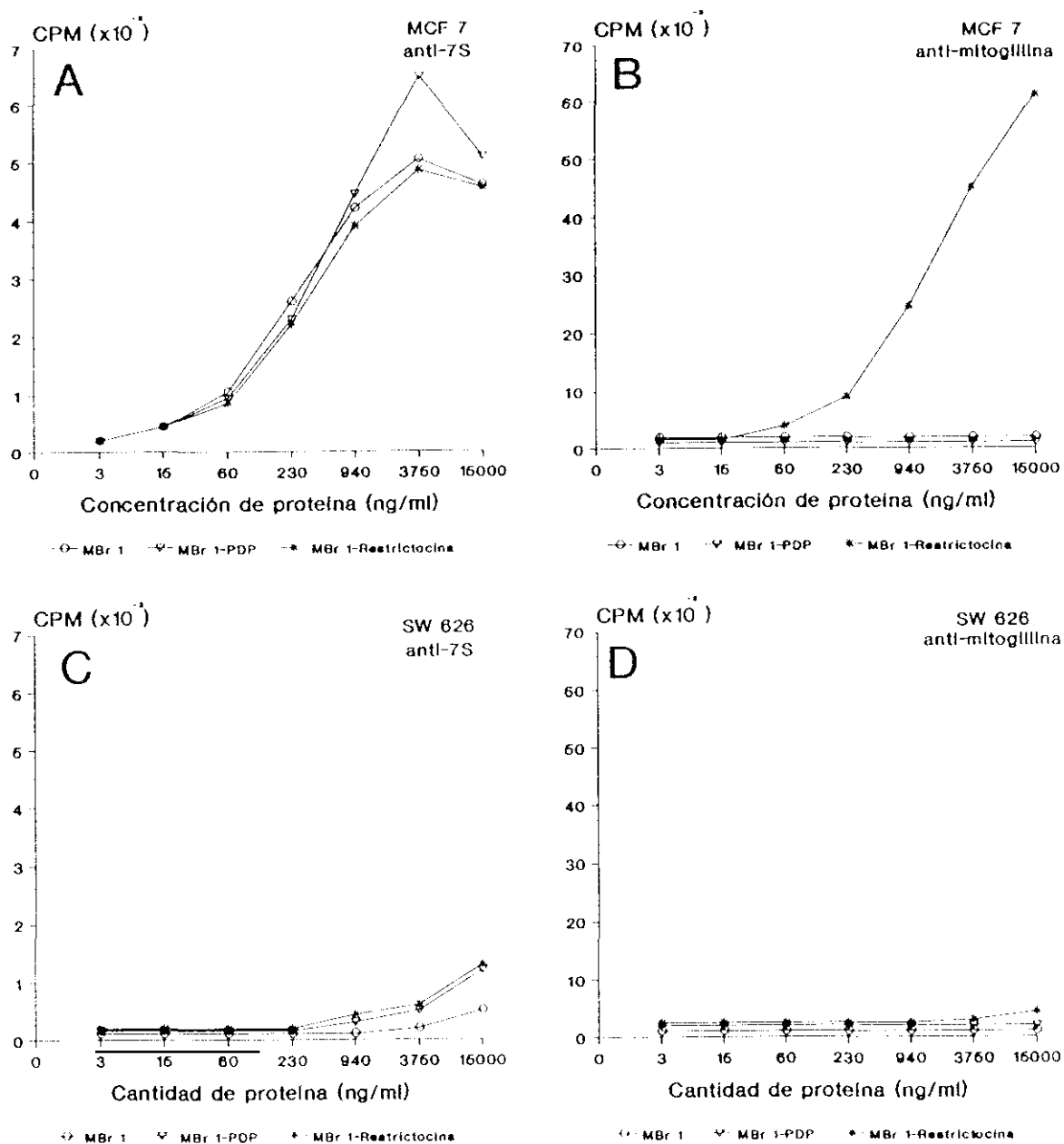


Fig. 3.66. Curvas de fijación de las fracciones MBr 1, MBr 1-PDP y MBr 1-restrictocina a MCF 7 y SW 626. Células de las líneas celulares MCF 7 (A y B) y SW 626 (C y D), fueron incubadas con distintas concentraciones de cada una de las fracciones, tras la incubación, en los pocillos se añadieron alícuotas de ¹²⁵I- α -7S (A y C) e ¹²⁵I- α -mitogillina (B y D). En las gráficas se representa el número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos, para cada una de las concentraciones de proteína ensayadas. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.8.2.2.1.

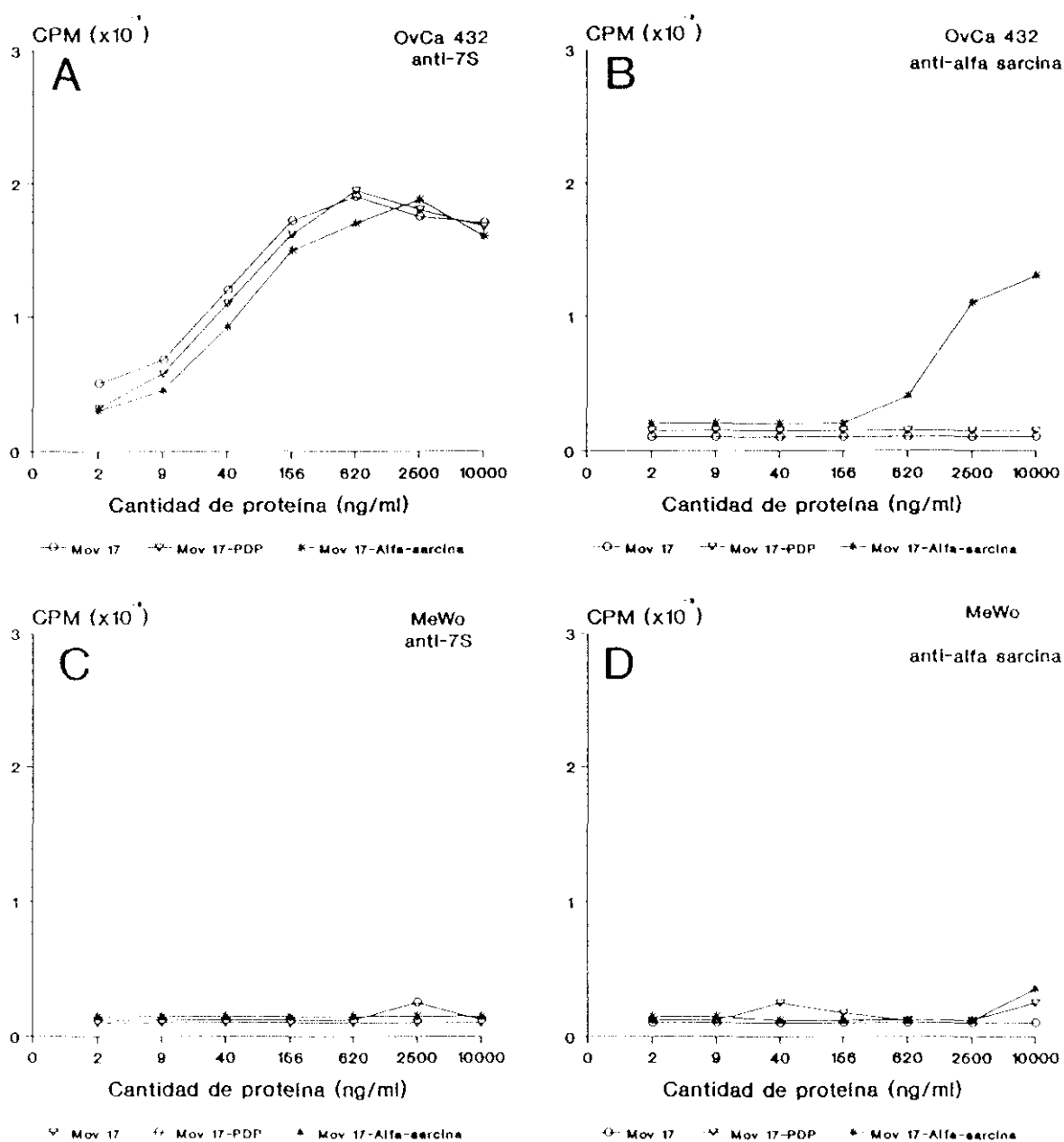


Fig. 3.67. Curvas de fijación de las fracciones Mov 17, Mov 17-PDP y Mov 17- α -sarcina a OvCa 432 y MeWo. Células de las líneas celulares OvCa 432 (A y B) y MeWo (C y D), fueron incubadas con distintas concentraciones de cada una de las fracciones descritas. Tras la incubación, en los pocillos se añadieron alícuotas de ^{125}I - α -7S (A y C) e ^{125}I - α -sarcina (B y D). En las gráficas se representa el número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos, para cada una de las concentraciones de proteína ensayadas. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.8.2.2.1.

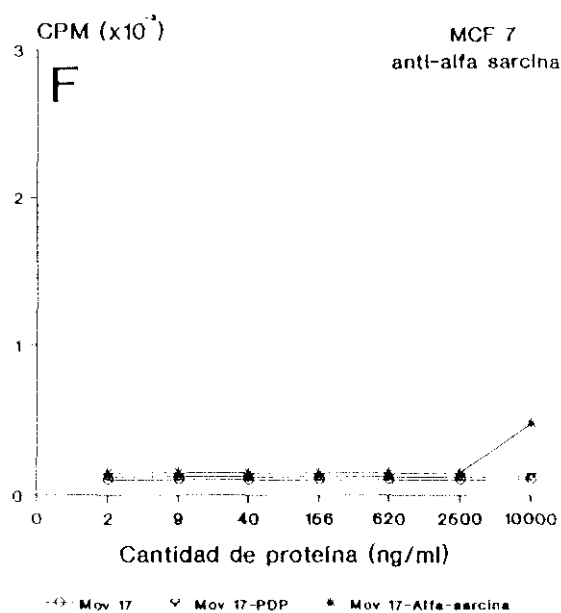
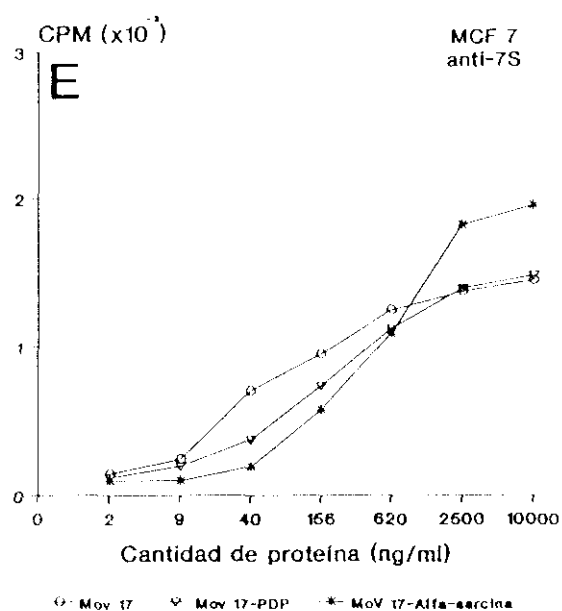


Fig. 3.68. Curvas de fijación de las fracciones Mov 17, Mov 17-PDP y Mov 17- α -sarcina a MCF 7. Células de la línea celular MCF 7, fueron incubadas con distintas concentraciones de cada una de las fracciones indicadas. Tras la incubación, en los pocillos se añadieron alícuotas de ^{125}I - α -7S (E) e ^{125}I - α - α -sarcina (F). En las gráficas se representa el número de cuentas por minuto fijadas a los pocillos, para cada una de las concentraciones de proteína ensayadas. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.8.2.2.1.

Resultados similares se obtuvieron en los experimentos realizados con MoV 17- α -sarcina sobre OvCa 432 (figuras 3.67. A y B) y sobre MCF 7 (figuras 3.68. E y F) como células relevantes o diana, y sobre MeWo (figuras 3.67. C y D), línea celular no reconocida por el AcMo MoV 17.

Las fracciones ensayadas, MoV 17, MoV 17-PDP y MoV 17- α -sarcina, presentan pequeñas diferencias en su capacidad de unión con las células diana OvCa 432 y MCF 7 (figuras A y E), que para algunas de las concentraciones ensayadas llegaron a ser hasta de un 15 %. También pudo constatararse como el antisuero contra la α -sarcina reconoce específicamente a la proteína, presente en las inmunotoxinas, cuando esta interacciona con la superficie de las células relevantes.

Los niveles de fijación obtenidos para las distintas fracciones sobre MCF 7 (figuras 3.68. E y F) fueron menores que los observados sobre OvCa 432 (figuras 3.67. A y B). Este resultado puede estar relacionado con la menor capacidad de internalización y el menor número de receptores que presenta MCF 7 para MBr 1 con respecto a OvCa 432 (ver tabla 3.16).

Por tanto, según los resultados obtenidos, las inmunotoxinas sintetizadas reconocen específicamente las líneas celulares contra las que van dirigidas, presentando una capacidad de unión similar a los anticuerpos monoclonales. Sólo se observan pequeñas variaciones con las mayores concentraciones ensayadas que pueden ser atribuidas a interacciones inespecíficas de estas moléculas con la superficie celular. En las células no relevantes, que no expresan el antígeno correspondiente, los niveles de fijaciones inespecíficas no superaron el 20% de la unión total (ver figura 3.69).

3.9.2.2. Estudios de competición de unión a la superficie celular de las inmunotoxinas e intermediarios con MBr1

La especificidad de los anticuerpos monoclonales y de las inmunotoxinas sintetizadas con las aspergilinas fue también estudiada en experimentos de competición con distintas fracciones relevantes y no relevantes, según el método descrito en el apartado 2.8.2.2.1.

Como puede observarse en la figura 3.70. A, la fijación a células de MCF 7 de una muestra de 0.1 nM de ^{125}I -MBr 1 es inhibida casi completamente por las muestras de MBr 1, MBr1-PDP y MBr 1-restrictocina cuando se utilizan concentraciones equivalente. Las concentraciones necesarias de las tres fracciones para desplazaran el 50% de las cuentas de ^{125}I -MBr1 fijada a la membrana celular, resultaron ser muy similares, cifrandose en 8 nM para MBr1, 3.6 nM para MBr1-Restrictocina y 5.3 nM para MBr1-PDP.

Igualmente, según se recoge en la figura 3.70. B, las fracciones MBr 1 y MBr 1-PDP, son también capaces de competir por la unión a la célula con la inmunotoxina MBr 1-restrictocina. Así, para una concentración de 10 nM de ^{125}I -MBr 1-restrictocina se consigue inhibir el 50% de la fijación con una concentración de 17 nM de MBr 1 y de 70 nM de MBr 1-PDP.

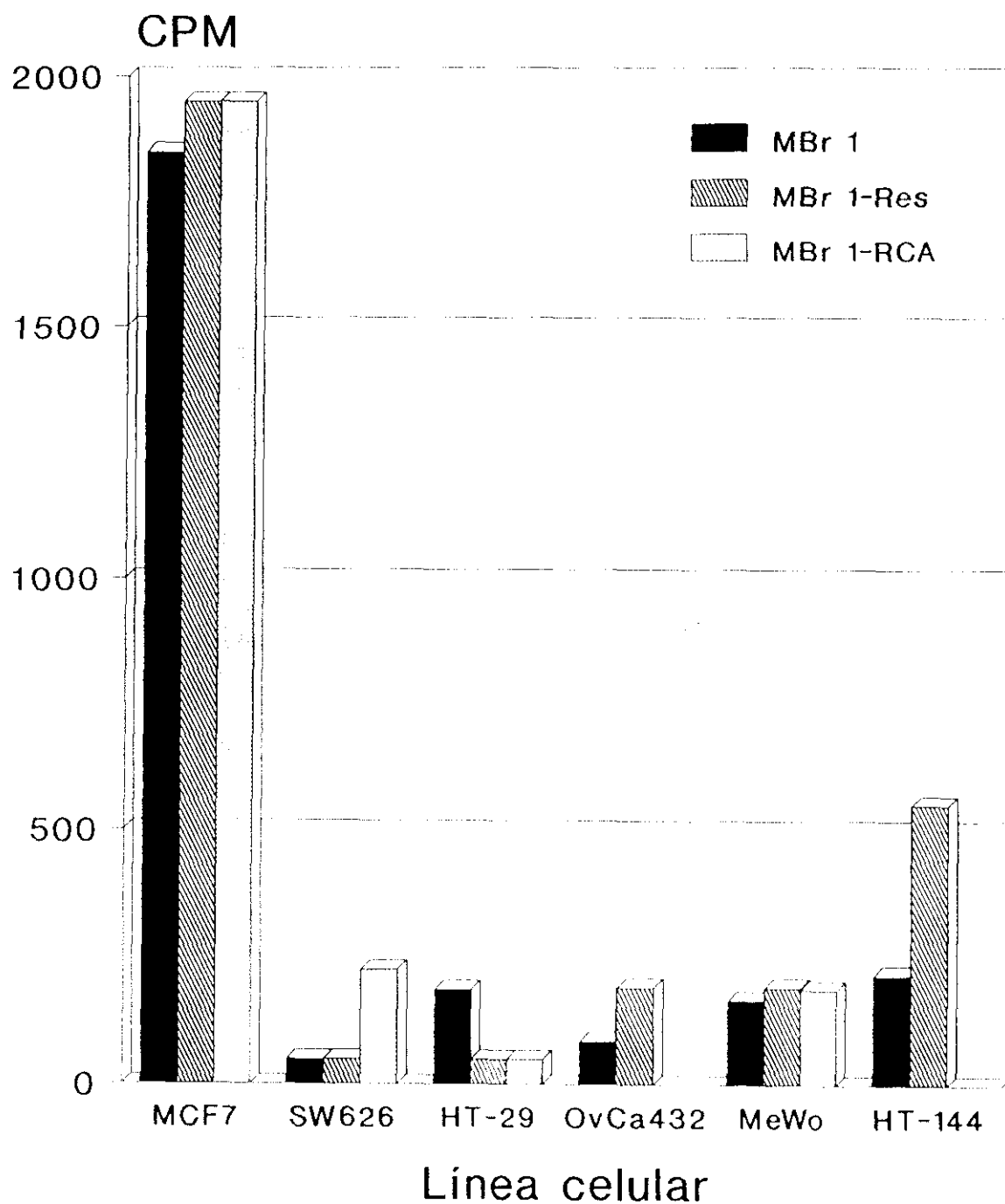


Fig. 3.69. Actividad de unión de MBr 1, MBr1-restrictocina y MBr 1-RCA a distintas líneas celulares. La valoración de la actividad de unión de cada una de las fracciones fue determinada por RIA en fase sólida, según se describe en el apartado 2.3.2.2.1. En todos los casos, las células se incubaron con una concentración de 7 nM de cada proteína, tras lo cual se añadió una alícuota de ^{125}I - α -TS. En la figura se recoge el número de cuentas por minuto obtenido para cada una de las fracciones en las distintas líneas celulares. En todos los experimentos, el número de cpm de los pocillos control no superó el valor de 400.

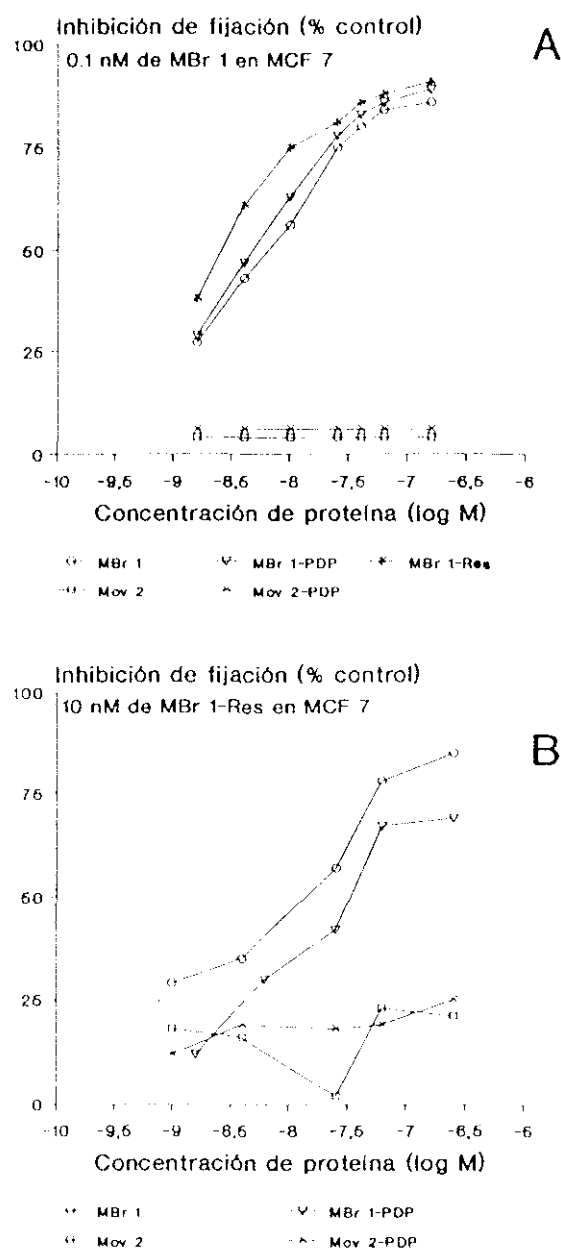


Fig. 3.70. Estudios de competencia entre la unión del anticuerpo monoclonal MBr 1 y distintas fracciones a células de la línea celular MCF 7

A) Las células fueron incubadas con una cantidad constante de ^{125}I -MBr 1 (0.1 nM) a la que se le añadieron distintas cantidades de las fracciones MBr 1 nativo, MBr 1-PDP, MBr 1-restrictocina, Mov 2 nativo y Mov 2-PDP. Tras tres horas de incubación, se determinó el porcentaje de inhibición de la fijación de la muestras del anticuerpo MBr 1 marcado a las células. Como 100% de unión, se consideró el número de cuentas por minuto unidas a células incubadas sólo en presencia del anticuerpo marcado.

B) Las células fueron incubadas con una cantidad constante de ^{125}I -MBr 1-restrictocina (10 nM) mezclado con distintas cantidades de las fracciones MBr 1 nativo, MBr 1-PDP, Mov 2 nativo y Mov 2-PDP. En este caso, también se determinó el porcentaje de inhibición de la fijación de radiactividad a las células, considerando el 100% de fijación el número de cpm unidas cuando las células se incuban sólo con el conjugado marcado.

Los detalles experimentales de los procedimientos de RIA seguidos, se describen en el apartado 2.10.2.2.

Ni el AcMo Mov 2, de clase IgM, ni su molécula derivada Mov 2-PDP son capaces de inhibir la fijación de MBr 1-restrictocina y MBr 1 marcados. Los valores de inhibición que se observan en la figura 3.70. B, para estas fracciones irrelevantes, puede ser explicados por dos razones: 1. la solución utilizada presenta una mayor concentración de proteínas que pueden impedir la fijación de las moléculas marcadas a las células y, 2. la aparición de interacciones inespecíficas debidas a los grupos PDP del anticuerpo monoclonal.

3.9.3. Actividad de las inmunotoxinas

3.9.3.1. Actividad de inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de células

En primer lugar, fue determinada la actividad de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo (ver apartado 2.10.1.1.) de las distintas fracciones obtenidas a lo largo del proceso de conjugación de MBr 1 con la restrictocina. Los porcentajes de inhibición de síntesis de proteínas obtenida con 5 µg de proteína total de cada una de las fracciones, se recogen en la tabla 3.19., donde también se indica la cantidad de restrictocina estimada en cada una de ellas.

Mientras que el anticuerpo monoclonal nativo MBr 1 no inhibe la síntesis de proteína, la fracción MBr 1-PDP mas SPDP (producto de la reacción entre el AcMo y el agente SPDP) presenta un porcentaje de inhibición de un 31.3%. Esta inhibición fue atribuida, una vez mas, a la alta reactividad de los grupos SH-reducidos de las moléculas de SPDP, que son capaces de interactuar con los puentes disulfuros de los ribosomas provocando una desactivación parcial de los mismos. Los estudios realizados por Jagus y col (459), en los que estos autores establecen una relación entre la actividad de los ribosomas y el número de grupos SH libres de los factores de iniciación, implicados en la síntesis de proteínas, apoyan esta hipótesis.

Los porcentajes de inhibición de síntesis obtenidos para las siguientes fracciones ensayadas, MBr 1-PDP + restrictocina-PDP, con un 55.5% de inhibición y MBr 1-restrictocina, con un 69.8%, están en concordancia con la concentración de restrictocina utilizada (0.5 µg en la reacción, que corresponden con una concentración de proteína de 6.0×10^{-7} M). Mientras que 5 µg de restrictocina y restrictocina-PDP (6.0×10^{-6} M), inhiben completamente la síntesis de proteínas, según se recoge en la tabla 3.1.

Estos resultados así como los experimentos realizados con las fracciones de la cromatografía en HCA-HPLC del conjugado MINT-5-α-sarcina (ver tabla 3.20.) confirman que la unión de las aspergilinas a los anticuerpos monoclonales, no dificulta su capacidad de actuación sobre los ribosomas.

Como puede observarse en los valores reflejados en la tabla 3.20., en condiciones no reductoras, el segundo pico de HCA-HPLC presenta mayor actividad que la α-sarcina aislada (ver tabla 3.18. A), mientras que esto no ocurre cuando las moléculas de

Tabla 3.19. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistema libre de células de las fracciones obtenidas durante el proceso de conjugación de MBr 1 con la restrictocina

En la tabla se recogen los porcentajes de inhibición de síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos de conejo, con respecto al control de síntesis, según se describe en el apartado 2.10.1.1. En todos los casos, se añadieron a la reacción de síntesis 5 µg de proteína total de cada una de las fracciones, en las que se estimó la cantidad correspondiente a la restrictocina.

Tabla 3.20. Inhibición de la síntesis de proteínas en sistema libre de células de la α-sarcina y de los picos eluidos de la columna de HCA-HPLC utilizada en la purificación de la inmunotoxina MINT-5-α-sarcina

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀, definidos como concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la síntesis de proteínas. Los valores recogidos en la tabla, se obtiene por interpolación en las curvas dosis-respuesta de cada una de las muestras ensayadas, en las siguientes condiciones A) en presencia de 5% v/v de 2-B-mercaptoetanol y B) en ausencia de mercaptoetanol. Los picos [1] y [2] se corresponden con los obtenidos en la cromatografía en HCA-HPLC de la muestra del conjugado MINT-5-α-sarcina, que aparece en la figura 3.65. El procedimiento experimental seguido se describe en el apartado 2.10.1.1.

Tabla 3.19.

fracción	inhibición de síntesis de proteínas (%)	cantidad de restrictocina (μ g)
control	0	0
MBr 1	0	0
MBr 1-PDP + SPDP	31.3	0
MBr 1-PDP + Res-PDP	55.5	0.5
MBr 1-Res	69.8	0.5
Res-PDP	100.0	5.1
Restrictocina	100.0	5.0

Tabla 3.20.

fracción	A	B
	IC ₅₀ ($M \times 10^{12}$)	IC ₅₀ ($M \times 10^{12}$)
α -sarcina	15.0	13.0
pico 2 HCA-HPLC	50.0	1.0
pico 3 HCA-HPLC	25.0	47.0

inmunotoxina presentes en dicha fracción se reducen con una concentración de 5% v/v de 2-β-mercaptoetanol (tabla 3.20. B) ya que la α-sarcina se libera de la molécula de anticuerpo. Esta evidencia hace pensar en que la actividad de esta toxina puede verse ligeramente favorecida cuando se encuentra unida al anticuerpo monoclonal, debido a que encuentra un anclaje en la molécula de inmunoglobulina.

3.9.3.2. Actividad citotóxica de las inmunotoxinas

La actividad citotóxica de las inmunotoxinas fue estudiada en las distintas líneas celulares relevantes y no relevantes para el anticuerpo monoclonal. En todos los casos, se determinaron los valores de IC₅₀ que fueron comparados por los valores obtenidos para la toxina correspondiente sobre cada una de las líneas celulares. También se determinó, como control negativo, la capacidad de los anticuerpos monoclonales para inhibir la síntesis de proteínas en las células. El procedimiento experimental queda recogido en el apartado 2.10.2.3.1.

Todas las inmunotoxinas resultaron activas en mayor o menor grado sobre sus células relevantes, excepto MLC2-restrictocina, y en todos ellos se observó que la actividad de las aspergilinas aumentaba cuando estas se unían a una molécula de anticuerpo monoclonal. El aumento de la citotoxicidad de las inmunotoxinas con respecto a la toxina nativa, fue determinado como valor de Índice terapéutico, definido como el cociente entre el valor de IC₅₀ obtenido para el conjugado y el valor de IC₅₀ de la toxina aislada sobre la misma línea celular.

3.9.3.2.1. Actividad citotóxica de las inmunotoxinas sintetizados con restrictocina

La actividad citotóxica de los cuatro conjugados de la restrictocina que mantuvieron una actividad de unión a las células diana superior o igual al 70% (ver tabla 3.18.), fue determinada en las líneas celulares en cultivo.

Como puede observarse en la figura 3.71. A y 3.72. A, en donde se recogen las curvas de inhibición de síntesis de proteínas de MBr 1, MBr 1-PDP, restrictocina y MBr 1-restrictocina sobre MCF 7, la fracción más tóxica resultó ser el conjugado, mientras que MBr 1 y MBr 1-PDP no son activos a ninguna de las concentraciones probadas (entre 0.5×10^{-7} M y 0.5×10^{-9} M).

Se obtuvieron resultados equivalentes para tres de los conjugados testados (MBr 1-Res, MLC1-Res y Mov 17-Res), según se recoge en la tabla 3.21., en donde puede observarse que estos presentaban valores de IC₅₀ inferiores en 2 ó 3 órdenes de magnitud a los obtenidos con la toxina. Estas inmunotoxinas no presentaron actividad sobre las líneas células no relevantes a las concentraciones ensayadas (entre 10^{-7} M y 10^{-11} M), ya que los porcentajes de inhibición de síntesis de proteínas obtenidos no superaron el 20 % de la síntesis total.

Los índices terapéuticos oscilaron entre un valor de 200

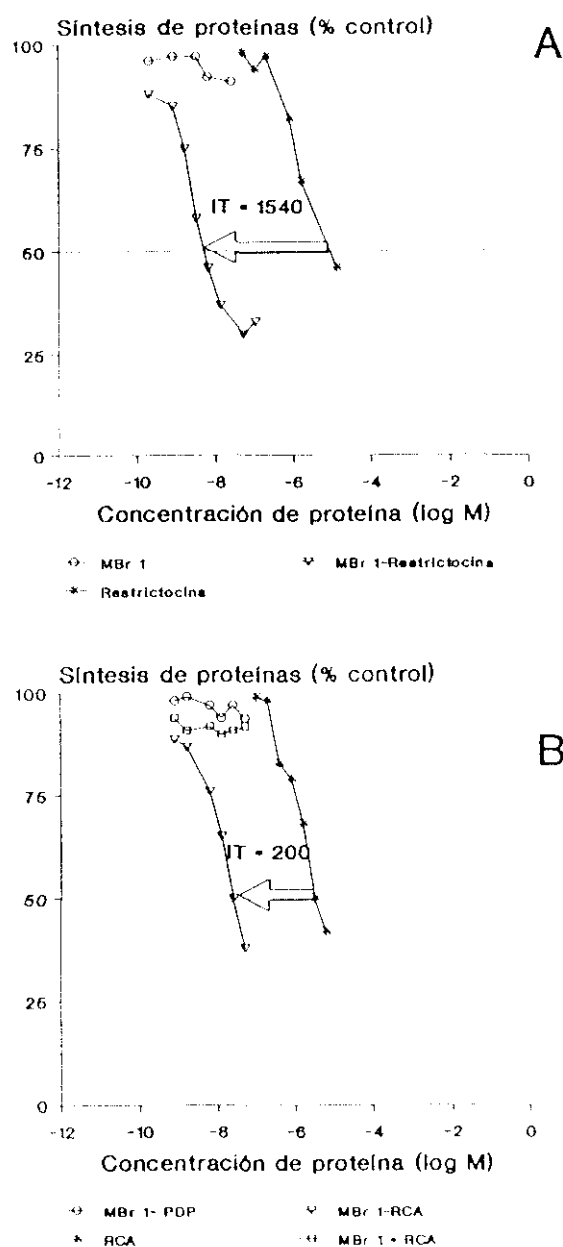


Fig. 3.71. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas de MBr 1-restrictocina y MBr 1-RCA en MCF7. Células de la línea MCF7 han sido incubadas en presencia de distintas concentraciones de cada una de las fracciones indicadas, determinándose en cada caso el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas. En A) se recogen los resultados obtenidos con MBr 1, restrictocina y MBr 1-restrictocina, en B) los obtenidos para las fracciones MBr 1-PDP, RCA y MBr 1-RCA. Como valor 100% de síntesis de proteínas, se consideró el número de cuentas por minutos de leucina tritiada incorporadas a células no tratada con ninguna de las muestras. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.10.2.3.1. En ambos casos se indica el valor del índice terapéutico (I.T. (◊)), definido como el cociente entre el valor de IC_{50} obtenido para la toxina y el IC_{50} obtenido para el conjugado.

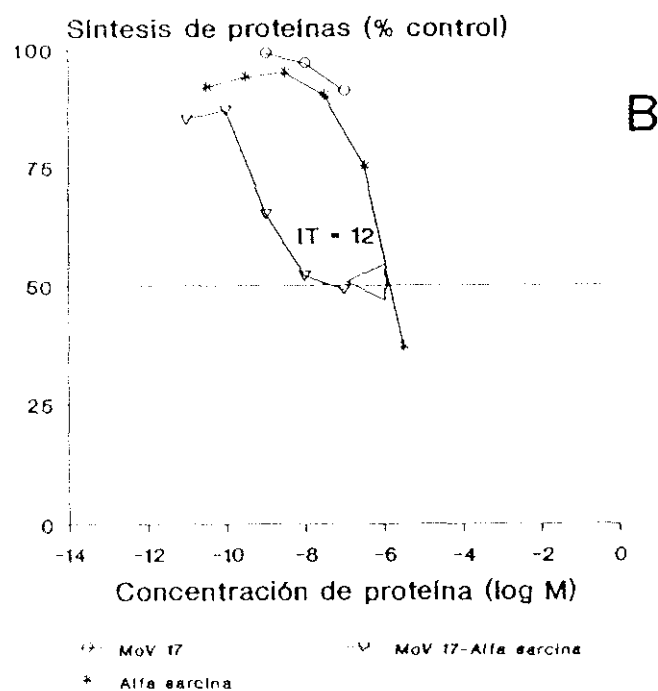
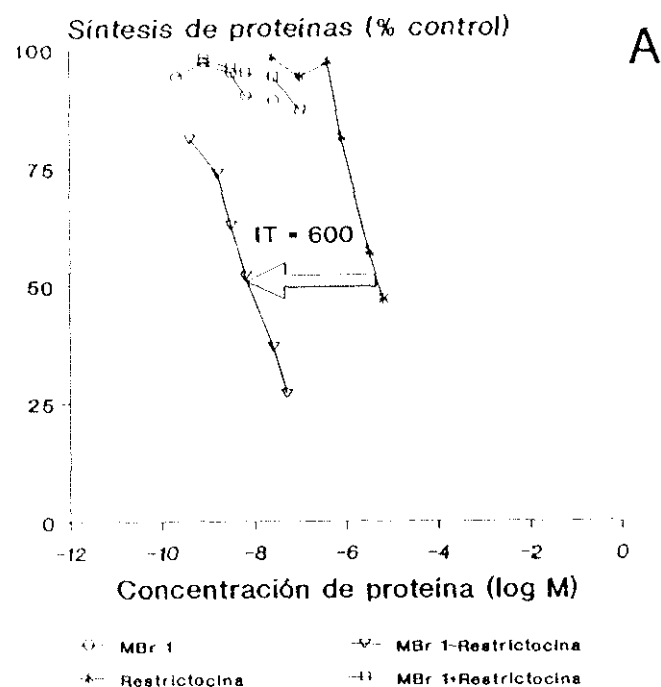


Fig. 3.72. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas de MBr 1-restrictocina y MoV 17- α -sarcina en MCF 7. Células de la línea MCF7 han sido incubadas en presencia de distintas concentraciones de cada una de las fracciones indicadas, determinándose en cada caso el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas. En A) se recogen los resultados obtenidos con MBr 1, restrictocina y MBr 1-restrictocina, en B) los obtenidos para las fracciones MoV 17, α -sarcina y MoV 17- α -sarcina. Como valor 100% de síntesis de proteínas, se consideró el número de cuentas por minutos de leucina tritiada incorporadas a células no tratada con ninguna de las muestras. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.10.2.3.1. En ambos casos se indica el valor del índice terapéutico (I.T.) (\square), definido como el cociente entre el valor de IC_{50} obtenido para las toxinas y el IC_{50} obtenido para las inmunotoxinas.

Tabla 3.21.

conjugado	línea celular		IC ₅₀ para:		
	diana	no diana	conjugado (Mx10 ⁶)	toxina (Mx10 ⁶)	índice terapéutico
MBr 1-Res	MCF 7		0.0065	10.0	1539
		HT-29	—	6.0	n.a.
		SW 626		15.0	n.a.
MLuCl-Res	MCF 7		0.050	10.0	200
		SW 626	0.020	15.0	750
		HT-144	—	1.6	n.a.
MLuCl2-Res	HT-29		—	6.0	n.a.
Mov 17-Res	OvCa 432		0.0035	4.0	1143
		MeWo		2.5	n.a.

Tabla 3.21. Estudio de la actividad citotóxica de las inmunotoxinas sintetizadas con la restrictocina en distintas líneas celulares

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀ obtenidos para las inmunotoxinas realizadas con la restrictocina en comparación con los obtenidos para la toxina nativa, sobre las distintas líneas celulares diana y no diana. En cada caso se indica el valor de índice terapéutico obtenido sobre las células diana calculado según se define en el texto (apartado 3.9.3.2.1.). La ausencia de valor indica que los conjugados presentaron sobre la célula correspondiente valores de inhibición de síntesis de proteínas inferiores al 20%, por lo que no se pudo calcular el IC₅₀. n.a. indica los casos en que no es posible llevar a cabo el cálculo del índice terapéutico. Los detalles experimentales se describen en el apartado 2.10.2.3.1.

obtenido con MLuCl-restrictocina sobre MCF 7 y un valor de 1539 para MBr 1 sobre la misma línea celular.

Estos valores de actividad resultan ser muy similares a la mayoría de los conjugados que han sido realizados con distintas toxinas de origen vegetal o con toxinas bacterianas, y algunos de cuyos ejemplos quedaron reflejados en la tabla 1.3. (366-369). Aunque han sido descritos factores de potenciación de la actividad superiores a 10.000 veces para inmunotoxinas realizadas con la cadena A de la ricina sobre células de tumores de origen linfóide (412), los resultados obtenidos puede considerarse muy interesantes, teniendo en cuenta que se han utilizado células tumorales de distinto origen y, en todos los casos, pertenecientes a tumores sólidos.

Así, según se recoge en la figura 3.71. B, MBr 1-restrictocina presentó un mayor nivel de citotoxicidad sobre MCF 7 que el conjugado MBr 1-RCA, con valores de IC_{50} de 0.0065×10^{-6} M para el primero y 0.013×10^{-6} M para el segundo, que se corresponde con índices terapéuticos de 1.540 y 200, respectivamente.

El conjugado MLuCl2-Restrictocina no presentó actividad sobre la línea tumoral HT-29, célula diana o relevante para el anticuerpo monoclonal. Esta falta de actividad fue explicada en base a los datos que sobre la internalización del anticuerpo monoclonal MLuCl2 en HT-29 se tienen. Según se recoge en la tabla 3.16., el anticuerpo presenta un porcentaje de unión a la célula de un 19% y, en los experimentos de microscopía electrónica, no pudo comprobarse su internalización (293).

3.9.3.2.2. Efecto de la monensina y el cloruro amónico en la actividad citotóxica de los conjugados MBr 1-Restrictocina

El efecto de ionóforos (380) y de agentes lisosomotrópicos (19) sobre la actividad de las inmunotoxinas fue ensayado para la inmunotoxinas MBr 1-restrictocina sobre células de MCF 7, siguiendo el método descrito en el apartado 2.10.2.3.3.. Para ello las células se incubaron con el conjugado, en presencia de distintas cantidades de NH_4Cl (10 nM, 20 nM y 40 mM) y de monensina (10 nM, 100 nM y 500 nM). En los casos en que fue posible, se determinó el valor de IC_{50} y se calculó el índice terapéutico según ha sido explicado. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3.22.

En primer lugar, se determinó el efecto de ambos agentes sobre las células de MCF 7, en ausencia del conjugado a dos tiempos distintos de incubación. Como puede observarse, cuando las células se incubaron con concentraciones superiores a 20 mM de NH_4Cl y a 100 nM de monensina durante 20 horas, ambos agentes inhibieron la síntesis de proteínas en más de un 50%. Este efecto no se observó cuando el tiempo de incubación se redujo a 3 horas.

La actividad de MBr 1-restrictocina no se vio incrementada cuando se utilizaron ambos agentes a concentraciones que no afectan a la síntesis de proteínas, de manera que los índices terapéuticos fueron similares, o ligeramente inferiores, a los

Tabla 3.22.

tratamiento	tiempo de tratamiento				
	3 h		20 h		
	síntesis de proteínas (% control)	IC ₅₀ (Mx10 ⁹)	síntesis de proteínas (% control)	IC ₅₀ (Mx10 ⁹)	índice terapéutico
control	100	15	100	11	1000
NH ₄ Cl 10mM	---	---	98	15	700
20mM	112	13	40	n.a.	
40mM	110	18	---	---	
Monensina 10nM	---	---	95	15	700
100nm	84	15	42	n.a.	
500nM	89	17	52	n.a.	

Tabla 3.22. Efecto de la monensina y el cloruro amónico (NH₄Cl) en la actividad de MBr 1-restrictocina sobre MCF7

Las células de la línea MCF7 fueron incubadas durante 3 horas y 20 horas con concentraciones decrecientes de MBr 1-restrictocina en presencia de distintas concentraciones de NH₄Cl y monensina. En la tabla se recogen los porcentajes de síntesis de proteínas observados cuando las células fueron incubadas sólo con ambos agentes (columnas 1 y 3), los valores de IC₅₀ obtenidos en cada caso para el conjugado en presencia o ausencia de los agentes (columnas 2 y 4) y el índice terapéutico calculado en cada caso (columna 5). n.a. indica los casos en que no es posible llevar a cabo el cálculo del índice terapéutico ya que los niveles de citotoxicidad eran bajos, y la ausencia de valor que el experimento no ha sido realizado. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.10.2.3.3.

obtenidos con el conjugado.

Estos resultados permite aventurar que la acidificación del citoplasma, mecanismo necesario para que algunas toxinas como la ricina o la toxina diftérica, manifiesten su actividad enzimática dentro de la célula, no parece ser necesaria en el caso de la restrictocina (124).

3.9.3.2.3. Actividad de las inmunotoxinas realizadas con α -sarcina

La actividad de las inmunotoxinas realizadas con α -sarcina fue estudiada de forma similar. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.23. y en las figuras 3.72. B. y 3.73. a 3.75.

Estos conjugados resultaron activos sobre sus células diana, y no presentaron actividad en células no relevantes. En este caso, las moléculas que presentaron mayor actividad fueron las de MINT-5- α -sarcina sobre las células de A 431 (ver tabla 3.23.). Las dos fracciones obtenidas a partir de la cromatografía en HPLC-HCA (ver figura 3.65.), presentaron niveles de toxicidad muy elevados, con valores de IC_{50} de 0.0003×10^{-6} M (3.0×10^{-10} M) para el pico 2 y de 0.0006×10^{-6} M (6.0×10^{-10} M) para el pico 3, con índices terapéuticos de 16.666 y 8.333, respectivamente. El conjugado Mov 17- α -sarcina presentó un valor de índice terapéutico sobre OvCa 432 de 2.000.

El distinto nivel de actividad mostrado por ambos conjugados realizados con α -sarcina, fue relacionado con la utilización de un segundo paso de purificación aplicado a MINT-5- α -sarcina, ya que otros parámetros como la citotoxicidad de la proteína en ambas líneas celulares (OvCa 432 y A 431) determinada como inhibición de síntesis de proteínas (ver tabla 3.23.) y el porcentaje de internalización de los AcMos MINT-5 y Mov 17 son similares (ver tabla 3.16.). La única diferencia observada entre ambos es el distinto número de moléculas de antígenos reconocidos por el AcMo, que aparecen expresados en la superficie de las líneas celulares y que han sido estimados en 800.000 para Mov 17 en OvCa 432 y en 1.300.000 para MINT-5 en A 431.

De esta manera, la cromatografía realizada en hidroxilapatita puede aumentar la eficacia de las inmunotoxinas, ya que las muestras no contienen AcMos libres que entran en competencia por la unión a los antígenos de membrana. Los resultados obtenidos hacen preveer que es posible aumentar aun más la eficacia de los conjugados realizados con las aspergilinas; para ello es necesario un análisis exhaustivo del nuevo método de conjugación y del método de purificación ya que esto permitirá evitar la formación de dímeros de AcMo y de conjugado, que dificultan la evaluación de los resultados obtenidos.

La relación entre el número de receptores para el factor de crecimiento (EGFr) presentes en la superficie celular, y la actividad de MINT-5- α -sarcina quedó demostrada cuando el conjugado fue probado sobre líneas celulares que presentan niveles de expresión de EGFr distintos, según se recoge en la tabla 3.24.

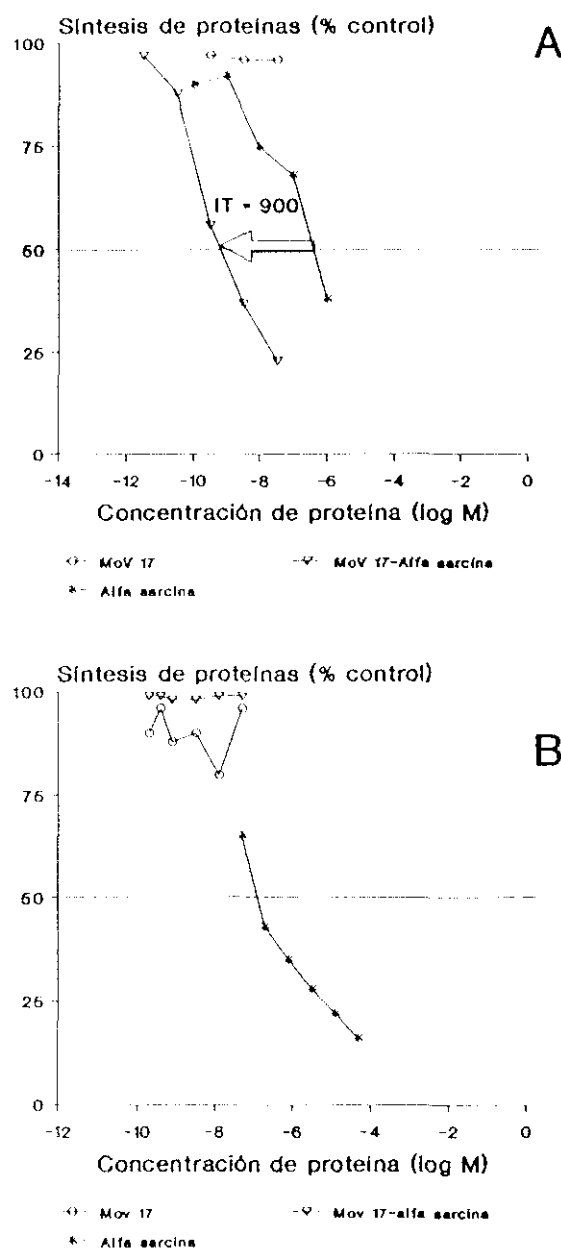


Fig. 3.73. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas de Mov 17- α -sarcina en MCF 7 y en MeWo

Células de la línea MCF 7 y MeWo, han sido incubadas en experimentos independientes, en presencia de distintas concentraciones de cada una de las fracciones indicadas en las figuras, determinándose en cada caso el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas. En A) se recogen los resultados obtenidos con Mov 17, α -sarcina y Mov 17- α -sarcina sobre MCF 7, en B) los obtenidos para las fracciones Mov 17, α -sarcina y para el conjugado Mov 17- α -sarcina sobre las células de la línea MeWo. Como valor 100% de síntesis de proteínas, se consideró el número de cuentas por minutos de leucina tritiada incorporadas a células no tratada con ninguna de las muestras. El procedimiento experimental se describe en el apartado 2.10.2.3.1. En ambos casos se indica el valor del índice terapéutico (I.T.) (\square), definido como el cociente entre el valor de IC_{50} obtenido para las toxinas y el IC_{50} obtenido para las inmunotoxinas.

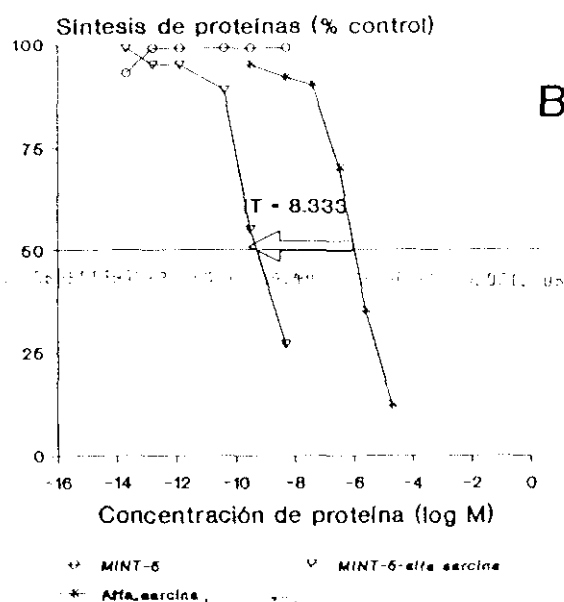
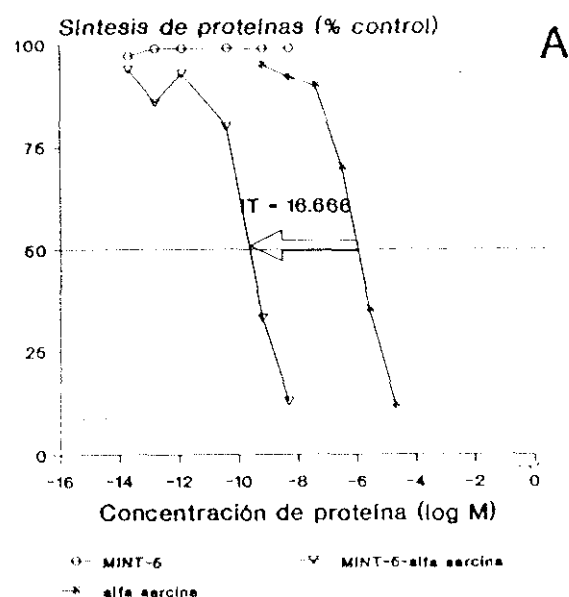


Fig. 3.74. Curvas de inhibición de síntesis de proteínas de MINT-5- α -sarcina en A 431

Células de la línea A 431 han sido incubadas en presencia de distintas concentraciones de cada una de las fracciones indicadas, determinándose en cada caso el porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas. En A) se recogen los resultados obtenidos con MINT-5, α -sarcina y el denominado pico [2] de HCA-HPLC (ver figura 3.65) y en B) se repiten las curvas de MINT-5 y α -sarcina, junto con el pico [3] de HCA-HPLC. Como valor 100% de síntesis de proteínas, se consideró el número de cuentas por minutos de leucina tritiada incorporadas a células no tratada con ninguna de las muestras. En ambos casos se indica el valor del índice terapéutico (I.T.) (\diamond), definido como el cociente entre el IC_{50} obtenido para la toxina y el IC_{50} obtenidos para el conjugado. Los picos [2] y [3], se corresponden con aquellos obtenidos en la cromatografía de MINT-5- α -sarcina en una columna de HCA-HPLC, cuyo análisis se recoge en la figura 3.65. El procedimiento experimental se recoge en el apartado 2.10.2.3.1.

Tabla 3.23.

conjugado	línea celular		IC ₅₀ para:		
	diana	no diana	conjugado (Mx10 ⁶)	toxina (Mx10 ⁶)	índice terapéutico
Mov 17-α-sar	OvCA 432		0.0015	3.0	2.000
	MCF 7		0.0020	0.6	400
		MeWo	3.0	n.a.
MINT5-α-sar	A 431		0.0003	5.0	16.666
			0.0006	5.0	8.333
		MeWo		3.0	n.a.

Tabla 3.24.

línea celular	EGFr receptores/ célula (x10 ⁻⁴)	IC ₅₀ para:		
		MINT-5 (Mx10 ⁶)	α-sarcina (Mx10 ⁶)	conjugados ⁽¹⁾ (Mx10 ⁶)
A 431	130 ⁽²⁾	5.0	0.0003
			5.0	0.0006
HT-29	6.5	3.0
MeWo	NEG		3.0	

Figura 3.75.

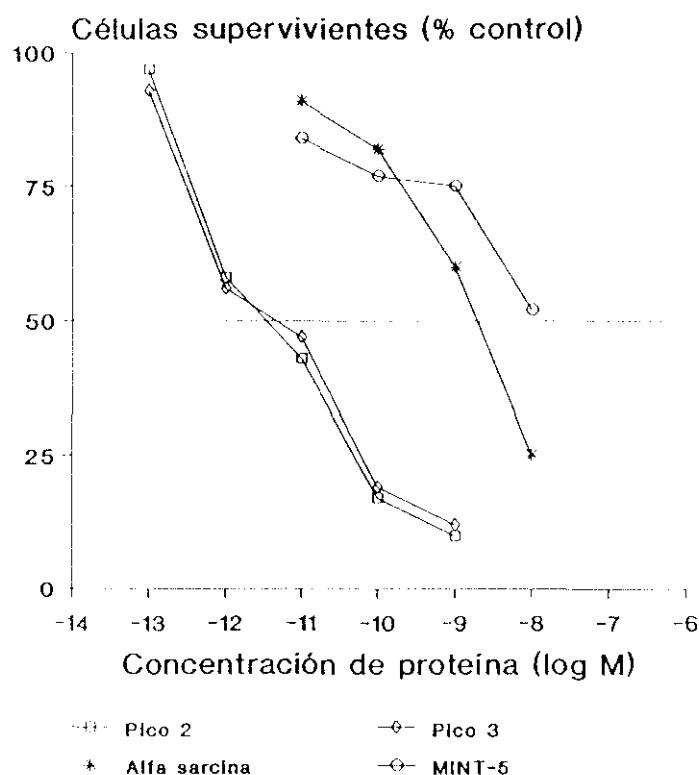


Tabla 3.25.

línea celular	IC ₅₀ para:		
	MINT-5 (Mx10 ⁶)	α-sarcina (Mx10 ⁶)	conjugados ⁽¹⁾ (Mx10 ⁶)
A 431	0.9	0.003	0.00003
			0.00004

Fig. 3.75. Curvas de actividad del conjugado MINT-5-α-sarcina sobre A 431, determinada como inhibición de la proliferación celular

En la figura se representan los porcentajes de inhibición de la proliferación celular cuando células de la línea celular A 431, son incubadas con distintas concentraciones del anticuerpo monoclonal MINT-5, α-sarcina y las fracciones [2] y [3] obtenidas en la elución de la columna de hidroxilapatita (HCA-HPLC) según se recoge en la figura 3.65. El procedimiento experimental se recoge en el apartado 2.10.2.3.2.

Tabla 3.25. Valores de actividad citotóxica de las distintas fracciones determinadas como inhibición de la proliferación celular

En la tabla se recogen los valores de IC₅₀ expresados en concentración micromolar (Mx10⁻⁶) obtenidos para cada una de las fracciones ensayadas, sobre células de la línea A 431. El procedimiento experimental de determinación de citotoxicidad se recoge en el apartado 2.10.2.3.2.

Como puede observarse, la inmunotoxina no resulta activa ni en las células de la línea HT-29 que presentan 650.000 receptores por célula, ni en las células de MeWo, que no expresan el EGFr. Sin embargo, muestran un alto nivel de toxicidad en células de la línea A 431, que expresan más de un 1 millón de moléculas del receptor.

Una observación similar puede hacerse con respecto al resto de las inmunotoxinas y sus células diana correspondientes, ya que el número de moléculas de antígeno reconocido por el AcMo, en la superficie de las células está comprendido entre 800.000 y 1.500.000 (ver tabla 2.4.). Estas diferencias pueden contribuir decisivamente a la actividad de las inmunotoxinas, aunque existen otras razones como el número de moléculas de PDP o MPT por molécula de AcMo, el número de moléculas de toxina o la internalización de los AcMos, que resultaron igualmente decisivas.

Por último, según se recoge en la figura 3.75. y en la tabla 3.25., cuando la actividad de las dos fracciones obtenidas en hidroxilapatita sobre la línea celular A 431 fue determinada como inhibición de la proliferación celular, pudo observarse como ambas fracciones se manifiestan mas activas, observandose aumentos de un orden de magnitud con respecto a los valores obtenidos en los experimentos de inhibición de la síntesis de proteínas (para el pico 2 se obtuvo un IC_{50} de 3.0×10^{-11} M frente a 3.0×10^{-10} M en los experimentos de inhibición de síntesis de proteínas, similar resultado se obtuvo para el pico 3).

Una vez más parece ser importante el método de determinación de la actividad de estas moléculas a la hora de evaluar los resultados obtenidos.

3.9.3.3. Actividad in vivo de MBr 1-restrictocina. Experimentos de neutralización del desarrollo de tumores en ratones nu/nu Balb/c

La actividad *in vivo* del conjugado MBr 1-restrictocina fue probada en ratones de la cepa nu/nu Balb/c. Cuando estos animales son inoculados por vía intraperitoneal con un determinado número de células de una línea tumoral, es posible observar como las células son capaces de crecer en el peritoneo del ratón, dando origen a nódulos de infiltración en distintos órganos que llegan a matar al animal(437,438).

En este caso, se estudió la capacidad de la inmunotoxina para neutralizar el desarrollo del tumor, incubando células de la línea tumoral MCF 7 con las distintas fracciones, según el protocolo experimental descrito en el apartado 2.11.4.

Según se recoge en la tabla 3.26., en los ratones inoculados con células tratadas con una concentración de 30 nM de MBr 1-restrictocina, se observó una drástica reducción en la diseminación del tumor cuando estos eran comparados con el grupo de animales control, inyectados con las células de MCF 7 en medio de cultivo. Dos de los 6 ratones no presentaron crecimiento alguno del tumor, mientras que en 3 de ellos solo aparecieron

Tabla 3.26.

tratamiento	actividad		
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	
	inhibición (%)	grado de desarrollo del tumor	valor medio
medio	0	3, 3, 3, 3, 3, 2	2.83±0.40
restrictocina	1	3, 2, 2, 3, 2	2.40±0.54
MBr 1	20	3, 2, 1, 2, 2	2.00±0.70
MBr 1-Res	68	0, 0, 1, 1, 1, 2	0.83±0.75

Tabla 3.26. Actividad *in vivo* de la inmunotoxina MBr 1-restrictocina, determinada como ensayo de neutralización del desarrollo de tumores en ratones nu/nu Balb/c

Alícuotas de 5×10^6 células de MCF 7 fueron incubadas con MBr 1 (30 nM), restrictocina (60 nM) y MBr 1-restrictocina (30 nM) o en medio de cultivo, e inoculadas en ratones nu/nu Balb/c, según se describe en el apartado 2.11.4.. Cuando los ratones estaban moribundos o a las 6 semanas de la inoculación, estos fueron sacrificados y se examinó el grado de desarrollo de tumor en los distintos órganos. El grado de crecimiento del tumor fue determinado según la siguiente escala: 0, no se observó crecimiento; 1, un solo nódulo de 2 mm ó 3 mm de diámetro o una pequeña infiltración en un órgano; 2, infiltración del tumor en más de un órgano; 3, infiltración masiva del tumor en más de un órgano, con nódulos de 5 mm de diámetro.

Para cada una de las muestras se determinó la capacidad de inhibición de la síntesis de proteínas en células de la línea MCF 7 en cultivo, según se describe en el apartado 2.10.2.3.1.

pequeños nódulos de crecimiento en la cavidad intraperitoneal.

Por el contrario, en los ratones inoculados con células tratadas con una concentración de 60 nM de restrictocina (60×10^{-9} M), no se observaron niveles significativos de reducción del crecimiento del tumor ya que la cantidad de proteína no es suficiente para inhibir la síntesis de proteínas en las células. La muestra de MBr 1 (30 mM) presentó un cierto nivel de actividad tanto en los experimentos realizados *in vitro* como en los realizados *in vivo*, este hecho puede estar en relación con la capacidad de inhibición de síntesis de proteínas y de proliferación celular que manifiestan distintos AcMos o, incluso, con la inducción de una respuesta inmune en los animales por activación del sistema de complemento (460) a la que ya se ha hecho referencia en la introducción.

4. Discusión general

4.1. Características de las aspergilinas

El principal objetivo de esta tesis ha sido el estudio de las características de las aspergilinas para su utilización en la síntesis de inmunotoxinas dirigidas contra células tumorales.

Dos de las proteínas incluidas en esta familia de toxinas de *Aspergillus*, la α -sarcina, aislada a partir del medio de cultivo de *A. giganteus* MDH 18894 (40), y la restrictocina, aislada del medio de cultivo de *A. restrictus* (191), han sido conjugadas químicamente con anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos expresados en la superficie de distintas líneas tumorales humanas de origen epitelial (12,13,24,265,266,276,414,415,416).

La elección de las aspergilinas ha sido hecha, en principio, por dos razones específicas. En primer lugar, por la disponibilidad en nuestro laboratorio de muestras de las proteínas originariamente aisladas por Olson, y de la posterior purificación de la proteína a partir de los medios de cultivo de los hongos y, en segundo lugar, por su mecanismo de acción.

Schindler y Davies, en 1977 (202) y Conde y col en 1978 (200), describen como las tres proteínas rompen un pequeño fragmento en el ARNr mayor de los ribosomas de levaduras y en polisomas de hígado de rata. Posteriormente, a principios de los años 80, Endo y col (45,193,205) atribuyen a la α -sarcina la hidrólisis de un puente fosfodiéster entre las bases G-4325 y A-4326 en el ARNr 28S.

Este sitio de corte está incluido en un lazo de ARNr cuya secuencia de nucleótidos aparece altamente conservada en los ribosomas a lo largo de toda la escala evolutiva (207) y es la misma secuencia en la que actúan la ricina de *Ricinus communis* y otras proteínas relacionadas (43-45).

Al analizar las características estructurales y funcionales de las aspergilinas, es posible deducir que estas toxinas presentan interesantes ventajas sobre otras proteínas tóxicas utilizadas en la generación de inmunotoxinas.

En primer lugar, están compuestas por una única cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente la mitad del que presentan las toxinas de una sola cadena o la cadena A de las toxinas bicatenarias (aproximadamente 17.000 frente a 30.000 de la cadena A de la ricina) (37).

Aparte de la ventaja que esto supone en ciertos aspectos, como su inmunogenicidad o su capacidad de difusión a través de los tejidos, sus pequeñas dimensiones permite obtener inmunotoxinas con un porcentaje de sustitución comprendido entre 1.3 y 2 moléculas de toxinas por molécula de AcMo, según se recoge en la tabla 3.18., tanto para anticuerpos de clase IgG (MoV 18, MLC1 o MINT-5) como de clase IgM (MBr 1). Este grado de sustitución no parece afectar a la actividad de unión de los anticuerpos monoclonales a las células y permite prever un aumento de la capacidad citotóxica del conjugado.

Una segunda ventaja de las aspergilinas con respecto a la cadena A de la ricina y a otras proteínas glucosiladas es, precisamente, el hecho de que estas proteínas carezcan de hidratos de carbono en su molécula (232). La eficacia de las inmunotoxinas hechas con ricina y con su cadena A se ve disminuida debido a que esta proteína presenta en su molécula sitios de unión a restos de manosa de la superficie de distintas células. Dicha unión, *in vitro*, podría dar origen a una barrera energética que bloquea el paso de la proteína a través del núcleo lipídico de la membrana celular (379) e, *in vivo*, es una de las posibles causas del rápido aclaramiento en sangre de la proteína (380).

Se han llevado a cabo numerosos intentos para eliminar las interacciones inespecíficas de la cadena A de la ricina (RCA), como la deglucosilación química de la molécula (69,330) o la utilización de RCA recombinante libre de hidratos de carbono (91), pero no ha sido posible eliminarlas por completo. Por otro lado, han sido descritas interacciones de las moléculas de inmunotoxinas realizadas con RCA deglucosilada con macromoléculas presentes en el plasma, tales como la α_2 -macroglobulina (381).

Muchas de las toxinas vegetales compuestas por una sola cadena son también glucoproteínas, como es el caso de la briodina de *Bryonia dioica* (52) o de la gelonina de *Gelonium multiflorum* (57). Por tanto, la aplicación de estas toxinas, *in vivo*, presentará los mismos problemas que han sido descritos para la cadena A de la ricina, derivados de la presencia de hidratos de carbono (69,295).

En los estudios de farmacocinética y de distribución en tejidos realizados en conejo, los parámetros obtenidos para ambas toxinas fueron distintos, según se recoge en la tabla 3.15. B.. El tiempo de vida media de la fase de eliminación, $t_{1/2\beta}$, de la restrictocina ha resultado ser sensiblemente mayor que el de la molécula de ricina completa; un 18% de la dosis de restrictocina inyectada permanece en plasma tras 24 horas, frente a un 6% de la dosis de ricina, según se refleja en la figura 3.52., lo que se traduce en un tiempo de vida media para dicha fase de casi cuatro veces mayor para la restrictocina que para la ricina (61.40 horas frente a 15.85 horas).

Según estos resultados, es posible establecer la hipótesis de que, una vez que ha tenido lugar la distribución de las proteínas en el organismo, la restrictocina se elimina de forma más lenta que la ricina. Por otro lado, los bajos niveles de radiactividad detectados en la orina y en las heces de los conejos inyectados con la aspergilina marcada y la diferencia en los valores de concentración de proteína por unidad de tiempo, determinados como área bajo la curva de aclaramiento ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$), permiten asegurar que esta proteína se mantiene en el animal en porcentajes muy elevados después de 24 horas (ver figura 3.54. B y tabla 3.15. B.).

La vida media de las moléculas en plasma es un factor muy importante para la utilización de las inmunotoxinas en el tratamiento de tumores sólidos (295,403), pero no resultan menos importantes otros mecanismos, como el transporte de estas moléculas o la interacción inespecífica con los distintos tejidos a lo

largo del torrente circulatorio (121). Según los resultados expuestos en esta tesis, mientras que la ricina puede interactuar con los glóbulos rojos (figura 3.53. A), la restrictocina podría circular en disolución en el plasma, llegando así más fácilmente a los órganos del animal (figura 3.53. B).

Los datos obtenidos sobre el acúmulo en tejidos de la restrictocina marcada (figura 3.54. A), muestran que mientras las toxinas glucoproteicas, como la ricina o su cadena A, quedarían retenidas mayoritariamente en el hígado, dando origen a altos niveles de hepatotoxicidad (120), la restrictocina se acumula en mayor porcentaje en testículo, vesícula biliar, riñón y ovario, y secundariamente en hígado (figura 3.54 A).

Gadina y col (461) demostraron en ratones en los que se determinaron los niveles de transaminasas como patrón de la hepatotoxicidad de estas proteínas, como dichos niveles de enzimas permanecen normales después del tratamiento con α -sarcina y el hígado de animal no sufre alteraciones aparentes. Gadina y col (461) para la α -sarcina, y Lamy y col (479) para el antígeno predominante de 18.000 de peso molecular de *Aspergillus fumigatus* Asfg-I, comprobaron que ambas proteínas aparecen localizadas en distintos órganos y se eliminan enteras a través de la orina, por lo que no serán digeridas por enzimas proteolíticas presentes en el plasma ni en los tejidos en los que se acumula. Por tanto, las aspergilinas parecen presentar unas características farmacológicas adecuadas para este tipo de terapia, sin olvidar que están sometidas a los mecanismos propios de eliminación de proteínas.

En tercer lugar, las aspergilinas han presentado actividades similares a las toxinas de una sola cadena, que carecen de actividad lectínica (37). En los estudios realizados en sistemas libres de células, en los que se determinó la capacidad de inhibición de síntesis de proteínas (ver tabla 3.1.), todas las toxinas han presentado niveles de actividad similares, con valores de IC_{50} comprendidos entre 10^{-11} M y 10^{-12} M.

Las diferencias de actividad observadas entre las tres aspergilinas podrían explicarse en base a la distinta composición de aminoácidos que presentan (193-195). Como es conocido, el grado de homología de secuencia entre la α -sarcina y las otras dos proteínas es de aproximadamente un 86% (195); estas diferencias podrían encontrarse entre los aminoácidos que componen el centro activo de la molécula o en los entornos del mismo (196) (figura 3.57.). Otros autores han descrito comportamientos diversos en la actividad de estas proteínas, así, por ejemplo, Sanz y Amils (209) apuntan como la mitogillina y la restrictocina no son capaces de cortar el ARNr de los ribosomas de *Sulfolobus solfataricus*, mientras que la α -sarcina sí lo es.

Sin embargo, sólo existe un aminoácido de diferencia entre la mitogillina y la restrictocina, situado en una de las zonas de homología entre las aspergilinas y las demás ribonucleasas de origen microbiano, que no parece ser suficiente para explicar estas variaciones en su actividad (figura 3.57.).

Debido a su limitada capacidad para penetrar en células normales y patológicas, las aspergilinas presentan baja toxicidad

dad, tanto *in vitro* sobre células en cultivo, como, *in vivo*, en ratones Balb/c (232). Esta toxicidad ha sido siempre comparable a la observada en las toxinas carentes de sitio lectínico (37).

La ricina resultó ser entre 4.5×10^6 y 3×10^3 veces más tóxica sobre las líneas celulares que las demás toxinas probadas, su cadena A purificada, es entre 10 y 100 veces más tóxica que las proteínas de una sola cadena (tablas 3.4. y 3.5.). Estos datos de citotoxicidad de la cadena A de la ricina, puede resultar engañosos, ya que resulta experimentalmente imposible eliminar por completo la cadena B y la reagregación de una pequeña parte de las moléculas de ricina, permitiría explicar estas diferencias. Mientras la actividad de la α -sarcina sobre las células se incrementa cuando se aumentan los tiempos de incubación, este hecho no se observa en el caso de la cadena A de la ricina (ver tabla 3.8. y figura 3.43.).

Teniendo en cuenta que, según los datos aportados por el grupo de Gavilanes (236-239), la entrada de las aspergilinas en las células podría estar mediada por la interacción de estas proteínas con moléculas de fosfolípidos cargados presentes en la membrana de la célula. Las diferencias observadas en la toxicidad de estas proteínas sobre las líneas celulares, pueden explicarse en base a la distinta composición lipídica de sus membranas y a la proporción de fosfolípidos que entran a formar parte de las mismas (238).

Cuando se estudian comparativamente los valores de IC_{50} obtenidos para tres de las toxinas, ricina, RCA y restrictocina, sobre las distintas líneas celulares, puede observarse que los niveles de citotoxicidad de estas proteínas podrían estar en función del distinto nivel de sensibilidad a la acción de las toxinas que presenta cada línea celular, ya que parece existir una correlación directa entre los índices de toxicidad obtenidos para las tres proteínas sobre una determinada célula (figura 3.42. C).

Ha resultado interesante la comparación de los valores de citotoxicidad obtenidos por dos métodos distintos: inhibición de síntesis de proteínas e inhibición de la proliferación celular a distintos tiempos de incubación de las células con las toxinas. Con este segundo procedimiento (ver tablas 3.6. y 3.7.), la toxicidad de la α -sarcina se sitúa en dos o tres órdenes de magnitud mayor que los obtenidos por inhibición de la síntesis de proteínas.

Parece existir una relación directa entre la toxicidad y el tiempo de incubación de las aspergilinas con las líneas celulares, ya que, ésta aumenta cuando la incubación se prolonga durante 6 días. Por otro lado, estudios recientes llevados a cabo por Sung y col (370) han demostrado que las inmunotoxinas realizadas con toxinas capaces de hidrolizar el ARNr 28S, como es el caso de la ricina, aunque presenten una cinética de actividad más lenta, son mucho más eficientes en períodos de tiempo largos que los conjugados realizados con toxinas de origen bacteriano, como la toxina diftérica, que actúan inactivando los factores de elongación FE-2. Estos autores postulan que el método de valoración de la inhibición de la síntesis de proteínas no es el más indicado en estos casos (370). Probablemente el efecto de

inhibición de la toxina diftérica podría ser reversible, ya que, los ribosomas de las células no sufren alteraciones, al contrario de lo que ha sido demostrado para las toxinas vegetales y para las aspergilinas (221).

Cuatro de las toxinas, ricina, RCA, briodina y restrictocina, fueron inoculadas por vía intraperitoneal en ratones Balb/c, según se recoge en la tabla 3.13.. De las cuatro toxinas testadas, sólo la ricina es capaz de matar a los animales a las dosis inyectadas, con una LD₅₀ de 0.25 µg por ratón, dosis letal equivalente a las recogidas en la literatura (69,120). Ninguna de las otras tres proteínas resultaron tóxicas a dosis entre 60 y 120 veces mayores que la de ricina. La briodina purificada en nuestro laboratorio presentó una toxicidad menor a la calculada por Stirpe y col (52), quienes dan un valor de LD₅₀ de 14.5 mg/Kg de ratón a las 48 horas después de la inoculación.

Finalmente, los experimentos realizados muestran que las aspergilinas, cuando son inyectadas en forma nativa, resultan muy poco inmunogénicas en ratón y en conejo por lo que es necesario recurrir a métodos de inmunización más agresivos (ver tablas 3.14. y 3.15.). Esta característica presenta grandes ventajas a la hora de pensar en la aplicación de estas toxinas a la producción de inmunotoxinas, ya que, no inducirían respuesta inmune en los pacientes (136,295,393).

Es conocida la alta inmunogenicidad presentada en humanos por las toxinas de origen vegetal y bacteriano, con la presencia de anticuerpos naturales contra la toxina diftérica (462) y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (324), y con el desarrollo de anticuerpos contra la ricina, su cadena A o la abrina (463) y contra los conjugados realizados con la RCA (295,393) o con la exotoxina A (136,324).

Los resultados que se recogen aquí permiten observar como las toxinas de origen vegetal compuestas por una única cadena polipeptídica provocan respuesta inmune en ratones, mientras que dicha respuesta no se produce ni para la α-sarcina ni para la restrictocina, inyectadas en dosis de hasta 700 µg (ver tabla 3.14.).

Barbieri y Stirpe (37) describen una actividad inmunosupresora en toxinas como la PAP-S de *Phytolacca americana* y el HCI de *Hordeum vulgare*, descrita también recientemente por Bolognesi y col (66) para la α-momocarina de *Momordica charantia*. La presencia de una actividad similar está siendo estudiada en las aspergilinas, al igual que ha sido atribuida a metabolitos secretados por distintas especies patogénicas de hongos (464).

4.2. Elección de los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados han permitido diseñar dos tipos de estrategias terapéuticas o experimentales distintas. Por un lado, la mayoría de ellos están dirigidos contra antígenos asociados a tumores sólidos de origen epitelial que se expresan en la superficie celular, y contra los que han sido sintetizados (24,265,266,276,414,415); por otro lado, el anticuerpo monoclonal MINT-5 reconoce un receptor específico con

actividad biológica conocida, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) que se expresa en algunas líneas tumorales en número muy superior al que aparece en células normales (8-10).

MINT-5 reconoce el dominio extracelular del EGFr (416), de manera que, tras la interacción de este anticuerpo monoclonal con su antígeno, pueden observarse los siguientes efectos fisiológicos: 1) una completa inhibición de la fijación a su receptor cuando las células se incuban en presencia de EGF humano, 2) una rápida internalización de, aproximadamente, el 30% de los receptores específicos y 3) una inhibición de la proliferación celular en las células que presentan en su membrana una sobreexpresión de dicho receptor, según puede observarse en la figura 3.75. y en la tabla 3.25.

Ha sido demostrada, con anterioridad, la validez de todos los anticuerpos monoclonales como elementos útiles en cancerología. Pero, cuando estos AcMos se utilizan en la síntesis de inmunotoxinas, la primera característica que han de presentar es que induzcan una correcta internalización de los complejos antígeno-anticuerpo formados en la superficie celular (295).

Los estudios de internalización de los anticuerpos monoclonales indican una correlación entre la actividad de las inmunotoxinas y la suerte de los complejos antígeno-anticuerpo. Las aspergilinas (188), así como muchas otras toxinas (124,325) necesitan de una adecuada internalización para ser efectivas.

Los conjugados que han resultado inactivos (ver tablas 3.21. y 3.23.), aún cuando mantenían su actividad de unión a las células, y eran capaces de inhibir la síntesis de proteínas en sistemas libres de células, no presentaron actividad sobre sus células diana debido, entre otras causas, a que los anticuerpos no sufrían un proceso normal de internalización; de esta forma, anticuerpos como el MLuc1, fueron descartados de experimentos posteriores. No obstante, estos AcMos podrían ser utilizados en otros tipos de terapia, tales como la unión con isótopos radiactivos (6).

4.3. Elección de los agentes de unión

Para la síntesis de las inmunotoxinas han sido elegidos como agentes de unión aquellos que introducen puentes S-S, como el SPDP (326) y el SMPT (336), que son los agentes más frecuentemente utilizados. La necesidad de la reducción de los enlaces S-S introducidos entre el AcMo y la toxina en el interior de la célula para que las inmunotoxinas resulten activas, ha sido descrito en aquellas toxinas cuya entrada en las células está mediatizada por la interacción de su cadena B con la membrana celular (122). Por tanto, puesto que las aspergilinas no presentan sitio lectínico, no parecer ser necesaria la rotura de estos enlaces para que su actividad se lleve a efecto (122).

Mientras que en la molécula de la ricina o en su cadena A, pueden encontrarse grupos SH libres disponibles para la conjugación, las aspergilinas no los presentan, por lo que se hace necesaria la introducción de grupos PDP para poder llevar a cabo

la unión con el anticuerpo monoclonal (333). Por este motivo, resultó imprescindible buscar agentes que preservaran la actividad de las toxinas.

Tras el tratamiento con 5 veces exceso molar de SPDP, las aspergilinas sólo ven disminuida su actividad en menos de un 10% tanto en lisados de reticulocitos como en actividad sobre células, llegando sólo en algunos casos, a un máximo de un 20%, (ver tablas 3.2., 3.3. y 3.9.) mientras que otras toxinas de una sola cadena y carentes de grupos SH libres, como la exotoxina A de *Pseudomonas* (340) o la briodina (52), pierden en algunas ocasiones, hasta un 40% de su actividad original cuando son tratadas con el mismo tipo de agentes.

En los primeros conjugados sintetizados, la introducción de grupos SH en las moléculas de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo haciendo reaccionar el anticuerpo con SPDP. La estabilidad de los productos de reacción fue estudiada por Dosio y col (333), quienes estimaron como proporciones molares óptimas, entre moléculas de anticuerpo monoclonal y de agente de unión, las de 30 veces exceso molar para anticuerpos monoclonales de clase IgM y de 10 veces exceso molar en el caso de anticuerpos IgG. De esta forma se conseguía incorporar un número de grupos PDP óptimo para la posterior conjugación con las toxinas, sin que la mayoría de los AcMos vean alterada su capacidad de interacción con la superficie celular (figuras 3.66. a 3.69.). El número óptimo de moléculas resultó ser de 9 para los anticuerpos IgM y de 5 para los anticuerpos IgG (tabla 3.17.).

Cuando los anticuerpos monoclonales se hicieron reaccionar con cantidades mayores de SPDP, pudo observarse como aumentaba la unión inespecífica de las especies moleculares AcMo-PDP a la superficie de la membrana celular, según queda reflejado en la figura 3.68., ya que esta interacción inespecífica es debida a la alta reactividad de los grupos tiol unidos al anticuerpo (289).

También fue comprobada la estabilidad de los grupos PDP incorporados a los anticuerpos, observandose dos hechos destacables. En primer lugar, se formaban agregados de peso molecular superior a 300.000 en las muestras previas a la reacción de conjugación, como resultado de la unión de dos o más moléculas de AcMo-PDP o AcMo-MPT (ver figuras 3.62. y 3.65.). En segundo lugar, los grupos PDP y MPT incorporados eran relajados de la molécula de anticuerpo monoclonal, ya que estos originan fenómenos de desplazamiento nucleofílico que inducen reacciones de intercambio tiólico (333,465).

Según los datos que aparecen en la literatura (31), los enlaces S-S mediados por PDP presentan un relativo grado de estabilidad debido a que están expuestos al ataque de moléculas presentes en el plasma, como el glutatión, o a la acción de enzimas reductasas sintetizadas en distintos órganos (336,338,339). Por este motivo, en la conjugación del anticuerpo MINT-5 con la α -sarcina se utilizó, como agente de unión, el SMPT unido al anticuerpo monoclonal que permite la formación de enlaces S-S protegidos del ataque de estas moléculas de carácter reductor (336).

En este caso, también resultó decisiva la relación de concentración molar entre el agente SMPT y el anticuerpo monoclonal. Cuando se utilizó un exceso molar de SMPT 3 veces mayor a la concentración de MINT-5, no se observaron alteraciones funcionales significativas en el AcMo, mientras que con un exceso molar de 5 veces, aumentó la unión no específica del anticuerpo a la superficie de las células de A 431 (416). Los grupos MPT introducidos en la molécula resultaron estables a lo largo de todo el experimento y, como puede observarse en los geles de poliacrilamida correspondientes, al igual que ocurrió con los anticuerpos unidos a PDP, los grupos MPT inducen agregación de las moléculas de anticuerpos monoclonales (ver figura 3.64.).

Fueron utilizados agentes de unión que introducen enlaces tioéter C-S, como el SATA o el SIA, que evitan la interacción inespecífica de las inmunotoxinas con las células y previenen la formación de agregados al tratarse de enlaces químicos inertes, según apuntan Dosio y col (333). Pero, aunque ni los AcMos ni sus productos de conjugación perdieron capacidad de interacción con la superficie celular, los conjugados no resultaron activos sobre sus células relevantes (458).

Este resultado puede indicar que los grupos activos incorporados impiden o modifican el centro activo de la proteína o que, al contrario de lo que se había supuesto en un principio, es necesaria la rotura del enlace introducido entre la toxina y el anticuerpo monoclonal una vez la molécula ha sido internalizada por la célula (458).

4.4. Purificación de las inmunotoxinas

El principal problema que plantea la purificación de las inmunotoxinas, a nivel experimental, es la separación de las moléculas de anticuerpo monoclonal unidas a la toxina de aquellas que no se han unido (359).

Una de las técnicas utilizadas para la purificación de inmunotoxinas realizadas con ricina completa o con su cadena A, es aquella que aprovecha la capacidad de interacción de las proteínas con colorantes triazínicos inmovilizados (254,354). Con esta finalidad, se llevaron a cabo estudios de interacción de algunas de las toxinas con moléculas de Cibacron Blue F3GA en los que pudo observarse un comportamiento distinto para cada una de ellas.

La α -sarcina presentó variaciones en su capacidad de interacción con el Cibacron Blue, dependiendo de las condiciones experimentales en las que se realizó la cromatografía (ver tabla 3.10.). Como ha sido demostrado para un gran número de proteínas (433,454), parámetros como el pH, la fuerza iónica, el tampón de elución y la concentración de muestra aplicada son decisivos en dicha interacción. Los valores de pH bajos favorecen la retención, mientras que a pH 10 o a concentraciones de 0.1 M de fosfato, la mayor fracción de proteína se corresponde con el material no retenido.

Este hecho puede ser explicado porque, según señalan Liu y Stellwagen (455), altas concentraciones de fosfato facilitan la

absorción de los colorantes inmovilizados a la matriz; de aquí que disminuya la capacidad de retención de la columna. La interacción de la α -sarcina con el Cibacron Blue, ha sido atribuida a la carga polianiónica de la molécula (378), por tanto, cuando la proteína se coloca a pH 10, valor más próximo a su punto isoeléctrico, ésta pierde parte de su capacidad de interacción con el colorante (ver figura 3.36. B, cromatografía a pH 10).

La comprobación de los valores de toxicidad de las muestras sometidas a cromatografía en Cibacron Blue, según se recoge en la tabla 3.11., ha permitido definir dos poblaciones de moléculas distintas en las muestras analizadas. Así, en todos los casos, la fracción mayoritaria obtenida en la cromatografía de cada una de las proteínas, ha resultado ser la más activa, tanto en inhibición de síntesis de proteínas en sistemas libres de células como en células en cultivo, obteniéndose índices de relación de actividades entre la fracción mayoritaria y la minoritaria de cada toxina, que van desde 2.5 veces para la RCA hasta 100 veces para la α -sarcina (ver tabla 3.12.).

Por tanto, de acuerdo con su capacidad para interaccionar con Cibacron Blue en condiciones fisiológicas, las toxinas se pueden dividir en dos grupos: aquellas que interaccionan mayoritariamente con el colorante y las que no lo hacen. Este distinto comportamiento puede explicarse en base a que la RCA, la briodina y la gelonina son glucoproteínas, mientras que la PAP, la α -sarcina y la mitogillina no lo son. Sin embargo, según distintos autores, la molécula de RCA deglucosilada químicamente queda retenida en Blue Sepharose (254,412).

En cualquier caso, como demuestran Cumber y col (359), las moléculas de toxina pueden sufrir alteraciones en su capacidad para interaccionar con el Cibacron Blue cuando se conjugan con anticuerpos monoclonales.

Como ni la α -sarcina ni la mitogillina quedan retenidas de forma mayoritaria, fue necesario recurrir a otros métodos de purificación de las inmunotoxinas derivadas de las aspergilinas. Así, se utilizó la cromatografía en una columna de hidroxilapatita en sistema de HPLC de la que se han obtenido interesantes resultados.

4.5. Actividad de las inmunotoxinas

Cuando se determinó la actividad de los conjugados, los problemas planteados fueron de dos tipos. En primer lugar, como puede observarse en la tabla 3.18., en dos de las inmunotoxinas realizadas con la restrictocina (MoV 18-restrictocina y MoV 19-restrictocina), disminuyó significativamente su capacidad de fijación a las células relevantes con respecto a la mostrada por el AcMo; este hecho está en relación con un excesivo número de moléculas de PDP incorporadas al anticuerpo, que conlleva un mayor número de moléculas de toxina y la consecuente pérdida de actividad del conjugado (333). En segundo lugar, para algunos anticuerpos como el MLC2 no ha podido ser demostrada la internalización de los complejos antígeno-anticuerpo (293).

Las inmunotoxinas realizadas con la restrictocina y con la α -sarcina que resultaron activas, presentan un buen nivel de actividad en las células relevantes, con índices terapéuticos que van desde 200 a 2.000 (ver tablas 3.31. y 3.23.). Estos valores son comparables con los obtenidos para otras moléculas sintetizadas con distintas toxinas (189,335,336,342,362,365,366,381).

En el caso de MINT-5- α -sarcina, la cromatografía realizada en HCA-HPLC, permitió la separación de la fracción de anticuerpo monoclonal no conjugado, según se recoge en la figura 3.265. B. Las dos fracciones de inmunotoxinas obtenidas muestran un excelente nivel de citotoxicidad sobre las células de la línea tumoral A 431, con índices terapéuticos de aproximadamente 8.500 para el pico 2 y de 16.500 para el pico 3 (ver tabla 3.23.), entre 10 y 25 veces mayores que los valores obtenidos en los primeros conjugados.

Estas inmunotoxinas presentaron valores de IC_{50} en inhibición de síntesis de proteínas del orden de entre 10^{-10} M y 10^{-11} M y en inhibición de proliferación celular de entre 10^{-11} M y 10^{-12} M (ver figuras 3.74. y 3.75.), por lo que, como apuntan Vitetta y col (295), pueden ser considerados como moléculas con un nivel de actividad óptimo para ser aplicados en ensayos clínicos.

MBR1-Restrictocina resultó ser más activo sobre MCF7 que MBR1-RCA. Las concentraciones utilizadas de agentes lisosomotrópicos como el NH_4Cl y de ionóforos como la monensina, no son capaces de potenciar la actividad de este conjugado (ver tabla 3.22.). Estos agentes provocan la acidificación del interior de la célula, que parece ser necesaria para que toxinas como la ricina o la toxina diftérica desarrollen su actividad citotóxica (124) por tanto, aunque los resultados han de ser considerados como preliminares, los fenómenos de acidificación no parecen ser decisivos en la actividad de esta toxina y no afectan al proceso de internalización de la misma como, por otro lado, Wiedlocha y col (366) demostraron ocurría con la viscumina.

En todos los casos, los conjugados fueron inactivos sobre células de líneas tumorales y normales no relevantes, según se recoge en las tablas 3.21. y 3.23., lo que demuestra que estas moléculas presenta una buena especificidad sobre las células reconocidas por el anticuerpo monoclonal.

El número de moléculas de antígeno expresadas en la superficie celular y la regulación de su expresión, condicionan la actividad de las inmunotoxinas (14). Ha podido comprobarse que existe una correlación estadísticamente significativa ($p > 0.001$) entre la actividad de MINT-5- α -sarcina y el número de moléculas de EGFR expresado en la superficie de la células, de manera que sería necesaria una expresión próxima a 10^6 moléculas por célula para que la inmunotoxina resulte activa (416 y tabla 3.24.). El resto de los antígenos reconocidos por los AcMos con los que han sido conjugadas las toxinas, presentan niveles de expresión similar en la membrana de las células diana (24,265,266,276,414,415).

El estudio *in vivo* de MBR 1-restrictocina, demostró que éste es capaz de neutralizar el desarrollo del tumor en animales

(ver tabla 3.26.). Los niveles de actividad fueron significativamente menores a los obtenidos en los experimentos *in vitro*, sobre las células en cultivo. Pero las diferencias observadas entre los niveles de actividad de las inmunotoxinas en experimentos realizados *in vitro* y su estudio en modelos animales es un fenómeno generalizado; así por ejemplo, como apuntan Vitetta y col (466), las inmunotoxinas realizadas con la cadena A, resultan aproximadamente unas 1.000 veces menos activos en ratón que sobre células en cultivo o, como demuestran Pai y col (136), es posible observar reacciones cruzadas de los AcMos unidos a moléculas de la exotoxina A de *Pseudomonas*, con tejidos normales de los pacientes que no habían sido observados en animales.

Tras confirmar la actividad de las inmunotoxinas realizadas con las aspergilinas en los cultivos celulares se plantean, como pasos siguientes, la realización de los experimentos encaminados a estudiar su cinética, su distribución en tejidos y su capacidad para alcanzar el tumor en los órganos donde éste se desarrolle. Según describen Wawrzynczak y col (189), la conjugación de la α -sarcina con AcMos dirigidos contra células de carcinoma de próstata, aumenta la vida media de la toxina en el plasma ya que los AcMos son moléculas capaces de permanecer en circulación durante varios días. Este hecho, asociado a los resultados obtenidos sobre aclaramiento en plasma de la restrictocina, su distribución en tejidos y la baja inmunogenicidad que presentan las aspergilinas en animales, hace prever un buen comportamiento farmacocinético de los conjugados. Estrategias como la utilización de fragmentos de IgG en vez de la molécula completa (295) o de anticuerpos monoclonales humanizados obtenidos por ingeniería genética (307,310,311), que harían disminuir sensiblemente la respuesta inmune del paciente contra los componentes de la inmunotoxina, podrían permitir aumentar la capacidad terapéutica de estas moléculas.

Como apunta Mendelsohn (121), aun queda mucho camino por recorrer antes de que las inmunotoxinas puedan ser utilizadas como forma de terapia definitiva. Sin embargo, la importancia de su especificidad exclusiva, permite mantener expectativas razonables para continuar diseñando ensayos clínicos basados en la investigación preclínica.

4.5. Mejoramiento de las condiciones de obtención de α -sarcina

Tras la identificación de la cepa de *Aspergillus* como *A. giganteus* MDH 18894 (figuras 3.1 a 3.5) y la obtención de α -sarcina en las condiciones descritas por Olson y col (40), se realizaron estudios sobre distintos medios de cultivo del hongo con el fin de obtener un medio más apropiado para la producción de la proteína. Como había sido referido anteriormente por distintos autores (40,192) y, según fue comprobado en nuestro laboratorio, la producción de la α -sarcina está en relación con los requerimientos nutricionales y la composición del medio de cultivo.

La relación entre las fuentes de carbono y de nitrógeno y la síntesis de metabolitos o enzimas tales como la glucoamilasa, por distintas cepas de *Aspergillus* se conoce desde que estos hongos han sido utilizados en procesos industriales (467).

Los nuevos medios ensayados resultaron muy adecuados, ya que los niveles de proteína detectados fueron mayores a los obtenidos en las condiciones iniciales descritas por Olson (ver figura 3.18.).

El medio elegido para el cultivo del *Aspergillus* fue el denominado medio 4, en condiciones de temperatura ambiente y sin agitación ni aireación suplementaria (ver tabla 2.6.). Aunque no fue el medio en el que se detectó la mayor cantidad, sí fue en el que los valores de los parámetros estudiados se mantuvieron más estables y en el que la concentración de proteína se mantuvo constante tras alcanzar el valor máximo (ver figuras 3.12. y 3.13.).

4.6. Comparación de las aspergilinas con otras ribonucleasas

Las toxinas vegetales y las aspergilinas son consideradas como ribonucleasas altamente específicas, ya que son capaces de reconocer y llevar a cabo su actividad sobre una sola base entre las 7.000 bases, aproximadamente, que constituyen el ARNr 28S de la subunidad mayor de los ribosomas de hígado de rata (205).

Estas proteínas han presentado, paralelamente, actividad ribonucleasa sobre distintos ácidos nucleicos o derivados sin una clara especificidad de base. Algunos autores atribuyen a la mitogillina una actividad ribonucleasa específica de guanina (201), comparable a la que presentan gran número de ribonucleasas aisladas de distintas especies de bacteria y de hongos, como la RNasa T1 de *Aspergillus oryzae*, la RNasa U2 de *Ustilago sphaerogena* o la barnasa de *Bacillus amylolyquefaciens* (255,256).

La α -sarcina y otros miembros de la familia de las aspergilinas (45 y Salvarelli, comunicación personal), son capaces de hidrolizar homopolímeros y heteropolímeros sintéticos de ácidos nucleicos, presentando la mayor actividad sobre polímeros que contienen inosina (I), y no sobre homo y heteropolímeros de adenina (A) o guanina (G), como hubiera sido de esperar (ver figuras 3.55. y 3.56). Aunque, según apuntan Yakovlev y col (260) los polímeros de ácido poliinosílico son los sustratos más apropiados para estudiar la especificidad de estas ribonucleasas sobre purinas.

Cuando se compara la secuencia de la α -sarcina con distintas ribonucleasas de origen bacteriano y fúngico, puede observarse que los aminoácidos que están implicados en el centro activo de la ribonucleasa T1 de *A. oryzae* (255) y que son Glu (E) 58, Arg (R) 77 e His (H) 92, aparecen situados en regiones equivalentes en todas las ribonucleasas estudiadas, y coinciden con los aminoácidos Glu (E) 96, Arg (R) 121 e His (H) 137 de la secuencia de la α -sarcina (ver figura 3.57.). Estos aminoácidos están incluidos en las zonas de coincidencia Glu (E) 96-Phe (F) 97-Pro (P) 98, Arg (R) 121-Tyr (Y) 122-Ile (I) 123, His (H) 50 e His (H) 97 (256).

Según Martínez y Smith (201), parece existir una clara relación entre estas proteínas y las diferencias en la longitud de la secuencia (entre 96 y 110 aminoácidos para el grupo de

ribonucleasas bacterianas y fúngicas que presentan similitud con la RNasa T1 y entre 149 y 150 para las aspergilinas) podría estar relacionada con la capacidad de las aspergilinas para entrar en las células, de la que carecen las demás ribonucleasas.

Las zonas de homología se encuentran distribuidas a lo largo de la secuencia de las aspergilinas, y se incluyen en zonas de hidropaticidad similares para todas las proteínas (468). Algunas de las diferencias de secuencia encontradas entre la α -sarcina y la restrictocina y la mitogillina, aparecen en estas zonas de coincidencia (ver figura 3.58.), lo que permite postular que las tres proteínas pueden presentar un centro activo no exactamente idéntico ni en cuanto a su secuencia ni en cuanto al entorno que lo circunda.

5. Conclusiones

Los resultados expuestos en este trabajo, permiten obtener, entre otras, las siguientes conclusiones:

1. Las distintas condiciones de cultivo utilizadas permitieron observar como el crecimiento de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, esta en función de factores tales como el pH, la concentración salina y la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo. Parece evidente que el comportamiento metabólico del hongo y la secreción de distintos metabolitos al medio están relacionados con su crecimiento, así como con la organización del micelio en la superficie del cultivo y con los procesos de esporulación.
2. En todos los medios y condiciones de cultivo, se detectó la presencia de α -sarcina tras las 24 primeras horas después de la siembra, obteniéndose las mayores concentraciones de proteína entre los días séptimo y noveno de cultivo. Se pudo observar, aunque no de forma tan drástica como apuntan otros autores, que la producción de la proteína depende de la composición de los medios de cultivo y de los requerimientos nutricionales del hongo.
3. La inclusión de digerido triptico de caseína entre los componentes del medio resultó crítica en algunas de las condiciones estudiadas, observándose disminuciones considerables en la cantidad de proteína acumulada en el medio cuando el hongo era cultivado en condiciones que promueven la deficiencia de oxígeno.
4. Después de analizar los resultados, el medio líquido elegido para el cultivo de *A. giganteus* MDH 18894 fue el denominado medio 4, que si bien no es en el que se obtuvieron las mayores cantidades de proteína, si es el que presentó menor variabilidad en los parámetros examinados durante el tiempo que duró el experimento y menores fluctuaciones en la concentración de α -sarcina, tras alcanzar el máximo valor en el séptimo día de cultivo. Este medio, en el que las fuentes de carbono y de nitrógeno fueron sustituidas por productos comerciales parece aportar interesantes ventajas para la producción de la proteína a nivel semi-industrial.
5. Por otro lado, aunque los resultados obtenidos no fueron concluyentes, la producción de la proteína parece estar relacionada con los procesos de esporulación del hongo o de germinación de las esporas.
6. El nuevo método de purificación de la α -sarcina permitió alcanzar un mayor rendimiento y facilitó el proceso de obtención de la proteína, ya que esta no era sometida en ningún momento a condiciones extremas de pH. La proteína purificada presenta características bioquímicas, inmunológicas y funcionales similares a las de la proteína descrita por el grupo de Olson.

7. Tres de las proteínas tóxicas utilizadas fueron purificadas en el laboratorio por distintos procedimientos cromatográficos. Todas ellas presentaron características bioquímicas y funcionales similares a las descritas en la literatura, excepto la briodina, que resultó ligeramente menos tóxica en los experimentos realizados *in vivo*.
8. Las toxinas ensayadas presentaron una actividad similar en inhibición de síntesis de proteínas en un sistema de reticulocitos de conejo, con valores de IC_{50} comprendidos en un rango de concentración de entre 10^{-11} M y 10^{-12} M. Cuando fue comprobada su actividad citotóxica sobre las distintas líneas celulares tumorales humanas, aquellas proteínas compuestas por una sola cadena polipeptídica, que carecen de porción o de cadena lectínica y para las que no han sido descritas moléculas específicas en la superficie de las células que actúen como receptores, resultaron sensiblemente menos activas en los experimentos de inhibición de síntesis de proteínas, necesitando una concentración de entre 10^{-6} M y 10^{-7} M para alcanzar el valor de IC_{50} .

La ricina, compuesta por dos cadenas polipeptídicas, una de ellas capaz de interaccionar con restos de hidratos de carbono de la membrana y de inducir la internalización de los complejos ligando-receptor, mantiene unos niveles de citotoxicidad equivalentes a los obtenidos en sistemas libres de células.

Una observación similar puede hacerse con respecto a la actividad *in vivo* de estas proteínas, ya que sólo la ricina es capaz de matar a los animales inoculados por vía intraperitoneal, con una LD_{50} de 0.25 μ g por ratón.

9. El efecto tóxico de la α -sarcina sobre las células parece estar en función del tiempo de exposición de éstas a la acción de la proteína. Asimismo, es probable que la utilización de distintos métodos de determinación de la actividad citotóxica, como es el caso del estudio de la inhibición de la proliferación celular, permitan reconsiderar los datos que sobre la actividad de estas moléculas se han obtenido. Por el momento, este segundo método ha permitido observar un incremento de más de un orden de magnitud de concentración molar en la actividad de la α -sarcina y de sus conjugados.
10. En los estudios de interacción de las distintas toxinas con colorantes triazínicos inmovilizados, pudo observarse como la α -sarcina presenta variaciones en su capacidad de interacción con Cibacron Blue F3GA dependiendo de las condiciones experimentales en que se lleva a cabo la cromatografía. Valores de pH bajos (entre pH 2 y 5) favorecen la retención de la proteína, mientras que a pH 10, valor próximo a su punto isoeléctrico o concentraciones de fosfato de 0.1 M, hacen que la interacción no sea mayoritaria. Esta interacción con el colorante ha sido atribuida a la carga polianiónica de la proteína, sin olvidar la posible influencia de interacciones de tipo hidrofóbico.

Estos experimentos han permitido definir dos grupos de toxinas: aquellas que interaccionan mayoritariamente con el Cibracron Blue (cadena A de la ricina, briodina y gelonina) y las que no lo hacen (α -sarcina, mitogillina y PAP). El distinto comportamiento de las proteínas estudiadas puede explicarse en base a que las incluidas en el primer grupo son glucoproteínas, mientras que las que no quedan retenidas no lo son.

La comprobación de los valores de toxicidad de las fracciones de Affi-Gel Blue, ha hecho que sea posible obtener fracciones tóxicas más activas que las muestras originales. Por el momento, no ha sido posible establecer una hipótesis sobre si este hecho puede estar relacionado con un distinto mecanismo de actuación en función de la presencia o no en la molécula de hidratos de carbono.

11. Las características que presentan las aspergilinas, tales como la ausencia de glucosilación, su bajo peso molecular, su baja inmunogenicidad y sus comportamiento farmacocinético que hacen prever una mayor permanencia de estas proteínas en circulación, las hacen óptimas para ser utilizadas en la terapia de pacientes afectados por procesos neoplásicos, ya que no ocasionarán los problemas derivados de la aplicación de otras toxinas glucosiladas, las cuales provocan respuestas inmunes elevadas en el paciente y altos niveles de hepatotoxicidad.

Por otro lado, las aspergilinas se eliminan en baja proporción por la orina y por las heces, y se transportan probablemente disueltas en el plasma, llegando de esta forma más fácilmente a órganos altamente irrigados.

12. Los anticuerpos monoclonales utilizados reconocen de forma específica sus células diana y todos ellos, excepto MLuCl₁, son capaces de inducir la internalización en mayor o menor grado, de los antígenos de membrana que reconocen. Esta característica, así como el número de receptores por célula y la constante de afinidad que presentan por el antígeno, hacen de ellos óptimos candidatos para su utilización en el diseño de técnicas terapéuticas en las que se utilizan agentes que reconocen específicamente subpoblaciones o subtipos celulares como transportadores de moléculas activas.

La no inducción de internalización de los complejos antígeno-anticuerpo y la incorporación de un excesivo número de grupos bifuncionales en la molécula de inmunoglobulina, han resultado decisivos en la actividad de las inmunotoxinas sintetizadas con estos anticuerpos monoclonales.

13. Los agentes bifuncionales SPDP y SMPT, que introducen entre la molécula de anticuerpo monoclonal y la toxina un puente disulfuro (S-S), han permitido obtener enlaces estables que no alteran significativamente la actividad de las moléculas originales.

Tras el tratamiento con 5 veces exceso molar de SPDP, las aspergilinas ven disminuida su actividad, por norma general, en menos de un 10% tanto en lisados de reticulocitos

de conejo como sobre células en cultivo, llegando sólo en algunos casos, a observarse disminuciones de hasta un 20%. Otras toxinas, como la exototoxina A de *Pseudomonas* o la briodina pierden hasta un 40% de su actividad original cuando son tratadas con el mismo tipo de agentes.

El número de grupos PDP incorporados por molécula de aspergilina osciló entre 1.8 y 2.5, resultando óptimo para la actividad de las inmunotoxinas, un número medio inferior a 2. En cuanto a los anticuerpos monoclonales, se estimó como número óptimo de grupos reactivos incorporados el de 9 para los anticuerpos de clase IgM y de 5 para los de clase IgG.

Cuando se utiliza SMPT, como agentes de unión, un exceso molar de 3 veces mayor a la concentración de MINT-5, hace que el anticuerpo no sufra alteraciones significativas.

Con ambos agentes ha sido posible observar la aparición de agregados de alto peso molecular, tanto en la fracción del anticuerpo monoclonal unido a grupos PDP o MPT, como en las fracciones de los conjugados. Este hecho está en relación con la alta reactividad de los radicales -SH de ambas moléculas y se hace mas evidente cuando es la especie molecular AcMo-MPT, la que se reduce antes de la conjugación. Está en proceso de estudio la solución de este problema.

14. Las inmunotoxinas presentaron un buen nivel de actividad, con índices terapéuticos (I.T.) que sobrepasan el valor de 15.000 cuando se utiliza un segundo paso de purificación en HPLC-HCA, eliminando de esta forma la fracción de anticuerpo monoclonal no unido a la toxina.

Los niveles de toxicidad observados en células en cultivo para el conjugado MINT-5- α -sarcina, con valores de IC₅₀ comprendidos en un rango de concentración de entre 10^{-10} M y 10^{-11} M en inhibición de síntesis de proteínas y de entre 10^{-11} M y 10^{-12} M en inhibición de la proliferación celular, permiten apuntar que estos conjugados presentan una actividad óptima para ser aplicados en clínica.

Por otro lado, los conjugados obtenidos con las aspergilas α -sarcina y restrictocina, no presentan actividad sobre las líneas celulares no diana, que no expresan el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal, lo cual demuestra que pueden ser consideradas como moléculas altamente selectivas.

Parece existir una relación directa entre la actividad de las inmunotoxinas y el número de moléculas de antígeno expresado en la superficie de las células tumorales, así el conjugado MINT-5- α -sarcina es muy activo sobre las células de la línea A 431 que expresa 1.300.000 moléculas de EGFr por célula, mientras que no lo es sobre HI-29, que sólo presenta 65.000 moléculas del receptor del factor de crecimiento epidérmico por célula.

15. Por último, el conjugado MBr 1-restrictocina es capaz de neutralizar el desarrollo de líquido ascítico en ratones nu/nu Balb/c. cuando éstos son inoculados conjuntamente con células tumorales de la línea MCF-7, un carcinoma ovárico y la inmunotoxina.

Por todas estas consideraciones y aquellas que puedan deducirse del análisis de los resultados expuestos en esta tesis, las aspergilinas han de ser consideradas como proteínas idóneas para su utilización en la síntesis de inmunotoxinas dirigidas contra células neoplásicas, en las cuales se produce una alteración de la expresión de los antígenos de membrana con respecto a las células normales de las que provienen.

Asimismo, es posible considerar que puedan ser utilizadas en modelos experimentales orientados hacia la terapia de enfermedad humanas en las que aparecen poblaciones celulares antigénicamente distintas, tales como en los procesos infecciosos provocados por virus o por protozoos, que se acompañan de un aumento en la permeabilidad de las membranas celulares a las toxinas, o en los procesos autoinmunes asociados a la expresión de un antígeno del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

6. Referencias

1. FitzGerald, D.J., Willingham, M.C., Cardarelli, C.O., Hamada, D.J., Tsuno, T., Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1987) A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:4288-4292.
2. Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E. and Yang, J.P.S. (1968) Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature* 20:1352-1355.
3. Valeriote, F. and Putten, L. (1975) Proliferation dependent cytotoxicity of anti-cancer agents: A review. *Cancer Res.* 35:2619-2630.
4. Corvalan, J.R.F., Smith, W., Gore, V.A., Brandon, D.R. and Ryde, P.J. (1987) Increased therapeutic effect of vinca alkaloids targeted to tumor by a hybrid-hybrid monoclonal antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* 24:138-143.
5. Waldmann, T.A. (1991) Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 252:1657-1662.
6. Larson, S.M. (1990) Clinical radioimmunodetection, 1978-1988: Overview and suggestions for standardization of clinical trials. *Cancer Res.* 50: 892s-898s.
7. Lord, J.M., Roberts, L.M., Thorpe, P.E. and Vitetta, E.S. (1989) Immunotoxins. *Trends Biotechnol.* 3:175-179.
8. Masui, H., Kamrath, H., Apeel, G., Houston, L.L. and Mendelsohn, J. (1989) Cytotoxicity against human tumor cells mediated by the conjugate of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody to recombinant ricin A chain. *Cancer Res.* 49:3482-3488.
9. Gullick W.J., Downward J. and Waterfield M.D. (1985) Antibodies to the autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase as probes of structure and function. *EMBO J.* 4:2869-2877.
10. Gutowski, M., Briggs, S.L. and Johnson, D.A. (1991) Epidermal growth factor receptor-reactive monoclonal antibodies: Xenograft antitumor activity alone and as drug immunoconjugates. *Cancer Res.* 51:5471-5475.
11. Old, L.J. (1981) Cancer immunology: the search for specificity-G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 41:361-375.
12. Ménard, S., Tagliabue, E., Canevari, S., Fossati, G. and Colnaghi, M.I. (1983) Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res.* 43:1295-1300.
13. Colnaghi, M.I., Canevari, S., Conde, F., Fontanelli, R., Leoni, F., Ménard, S., Orlandi, R., Porro, G. and Ripamonti, M. (1987) Monoclonal antibodies: perspectives for tumor therapy, en "Monoclonals and DNA probes in diagnostic and preventive Medicine", Eds. Gallo, R.C., Della Porta, G and Albertini, A., Raven Press, New York, USA pp. 137-146.
14. Colnaghi, M.I. (1988) Monoclonal antibodies in breast cancer studies. *Baillière's Clinical Oncology* 2:85-101.
15. Jansen, F.K., Blythman, H.E., Carrière, D., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Laurent, J.C., Paolucci, F., Pau, B., Poncelet, P., Richer, G., Vidal, H. and Voisin, G.A. (1982) Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity. *Immunol. Rev.* 62:185-216.
16. Ehrlich, P. (1906) Magic bullets en "Collected Studies on Immunity". (Translated by C. Bolduan) John Wiley and Sons, Inc. New York, USA.

17. Ehrlich, P. (1956) The relationship existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action, en "The collected papers of Paul Ehrlich". Mimmelweite, F., Marquardt, M. and Dale, H. Eds. Pergamon, New York, USA, pp. 596-618.
18. Mathé, G., Loc, T.B. et Bernard, J. (1958) Effect sur la leucémie L1210 de la souris d'une combinaison par diazotation d'A-méthoptérine et de gamma-globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. C.R. Acad. Sci. (Paris) 246:1626-1630.
19. Moolten, F.L., Zajdel, S. and Cooperband, S. (1976) Immunotherapy of experimental animal tumors with antitumor antibodies conjugates to diphtheria toxin or ricin. Ann. N. Y. Ac. Sci. 277:690-699.
20. Moolten, F.L. and Cooperband, S.R. (1970) Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugate to antibody directed against antigens on the cells. Science 169:68-70.
21. Hertler, A.A. and Frankel, A.E. (1989) Immunotoxins: A clinical review of their use in the treatment of malignancies. J. Clin. Oncol. 7:1932-1942.
22. Jansen, F.K., Blythman, H., Carrière, D., Casellas, P., Gros, P., Paolucci, F., Poncelet, P., Richer, G. and Vidal, H. (1981) Replacement of the B chain of Ricin with specific conventional or monoclonal antibodies en "Receptor-mediated binding and internalization of toxins and hormones" Academic Press Inc., Orlando, USA. pp. 351-361.
23. Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497.
24. Mariani-Costantini, R., Colnaghi, M.I., Leoni, F., Ménard, S., Cerasoli, S. and Rilke, F. (1984) Immunohistochemical reactivity of a monoclonal antibody prepared against human breast carcinoma. Virchows Arch. [Pathol. Anat.] 402:389-404.
25. Frankel, A.E., Houston, L.L., Issell, B.F. and Fathman, G., (1986) Immunotoxins. Ann. Rev. Med. 37:125-142.
26. Olsnes, S., Fernández-Puentes, C., Carrasco, L. and Vázquez, D. (1975) Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Eur. J. Biochem. 60:281-288.
27. Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. and Okada, Y. (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. Cell 15:245-250.
28. Whitaker, S.J. (1992) DNA damage by drugs and radiation: What is important and how is it measured?. Eur. J. Cancer 28:273-276.
29. FitzGerald, D. and Pastan, I. (1989) J. Natl. Cancer. Inst. Targeted toxin therapy for the treatment of cancer. 81:1455-1463.
30. Kernan, N.A., Byers, V., Scannon, P.J., Mischak, R.P., Brochstein, J., Flomenberg, N., Dupont, B. and O'Reilly, R.J. (1988) Treatment of steroid-resistant acute graft-vs-host disease by in vivo administration of an anti-T-cell ricin A chain immunotoxin. JAMA. J. Am. Med. Assn. 259:3154-3157.
31. Blättler, W.A., Lambert, J.M. and Goldmacher, V.S. (1989) Realizing the full potential of immunotoxins. Cancer Cells 1: 50-45.

32. Chaudhary, V.K., Queen, C., Jungahns, R.P., Waldmann, T.A., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1989) A recombinant immunotoxin of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature* 339:394-397.
33. Johnson, V.G., Wrobel, C., Wilson, D., Zovickian, J., Greenfield, L., Oldfield, E.H. and Youle, R. (1989) Improved tumor-specific immunotoxins in the treatment of CNS and leptomeningeal neoplasia. *J. Neurosurg.* 70:240-248.
34. Lorberboum-Galski, H., Lafyatis, R., Case, J.P., FitzGerald, D., Wilder, R.L. and Pastan, I. (1991) Administration of IL-2-PE40 via osmotic pumps prevents adjuvant induced arthritis in rats. Improved therapeutic index of IL-2-PE40 administered by continuous infusion. *Int. J. Immunopharmac.* 13:305-315.
35. Lakkis, F., Steele, A., Pacheco-Silva, A., Rubin-Kelley, V., Strom, T.B. and Murphy, J.R. (1991) Interleukin 4 receptor targeted cytotoxicity: genetic construction and *in vitro* immunosuppressive activity of a diphtheria toxin-related murine interleukin 4 fusion protein. *Eur. J. Immunol.* 21:2253-2258.
36. Kreitman, R.J., Siegall, C.B., FitzGerald, D.J.P., Epstein, J., Barlogie, B. and Pastan, I. (1992) Interleukin-6 fused to a mutant form of *Pseudomonas* exotoxin kills malignant cells from patients with multiple myeloma. *Blood* 79:1775-1780.
37. Barbieri, L. and Stirpe, F. (1982) Ribosome-inactivating proteins from plants: Properties and possible uses. *Cancer Surveys* 1:489-520.
38. Pappenheimer, A. (1977): Diphtheria toxin. *Ann. Rev. Biochem.* 46:69-94.
39. Iglewski, B.H. and Kabat, D. (1975) NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2284-2288.
40. Olson, B.H. and Goerner, G.L. (1965) Alpha sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. *Appl. Microbiol.* 13:314-321.
41. Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Junek, A.J. and Schuurmans, D.M. (1965) Alpha sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Appl. Microbiol.* 13:322-326.
42. Goldin, A., Serpick, A.A. and Mantel, N. (1966) Experimental screening procedures and clinical predictability value. *Cancer Chemother. Rep.* 50:173-210.
43. Endo, Y. and Tsuguri, K. (1987) RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. *J. Biol. Chem.* 262:8128-8130.
44. Endo, Y., Tsuguri, K. and Lambert, J.M. (1988) The site of action of six different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA M-glycosidase activity of the proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150:1032-1036.
45. Endo, Y. and Wool, I.G. (1982) The site of action of alpha-sarcin of eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 257:9054-9060.
46. Carroll, S.F., McCloskey, J.A., Crain, P.F., Oppenheimer, N.J., Marscher, T.M. and Collier, R.J. (1985) Photoaffinity labeling of diphtheria toxin fragment A with NAD: Structure of the photoproduct at position 148. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7237-7241.

47. Carroll, S. and Collier, R. (1987) Active site of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A glutamic acid 553 is photolabeled by NAD and shows functional homology with glutamic acid 148 of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 262:7237-7241.
48. Stirpe, F. (1982) On the action of ribosome inactivating proteins: Are plant ribosomes species specific?. *Biochem. J.* 202:279-280.
49. Warden, C. and Waddell, L. (1884) The non bacillar nature of *Abrus precatorius* poison with observations on its chemical and physiological properties. Calcutta Bengal secretarial press.
50. Dixon, T. (1886-87) *Ricinus communis*. Australasian Med. Gaz 6:155.
51. Brocq-Rousseau, D. et Fabre, R. en "Les Toxines Végétales, Phytotoxines et phytoagglutinines", volumen VI, Serie Exposés de toxicologie et d'hygiène industrielle, Fabre, R. Publishier. Hermann & Cie. Editeurs, Paris, Francia pp. 3-4.
52. Stirpe, F.E., Barbieri, L., Battelli, M.G., Falasca, A.I., Abbondanza, A., Lorenzoni, E. and Stevens, W.A. (1986) Bryodin, a ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L. (white bryony). *Biochem. J.* 240:659-665.
53. Stirpe, F., Barbieri, L., Abbondanza, A., Falasca, A.I., Brown, A.N.F., Sandvig, K. and Pihl, A. (1985) Properties of Volkensin, a toxic lectin from *Adenina volkensii*. *J. Biol. Chem.* 260:14589-14595.
54. Irvin, J.D. (1975) Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 169:522-528.
55. Irvin, J.D., Kelley, J. and Robertus, J.D. (1980) Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivates eukaryotic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:418-425.
56. Stirpe, F., Williams, D.G., Onyon, L.J., Legg, R.F. and Stevens, W.A. (1981) Dianthins, ribosomes-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation) *Biochem. J.* 195:399-405.
57. Stirpe, F., Olsnes, S. and Pihl, A. (1980) Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 255:6947-6953.
58. Stirpe, F., Gasperi-Campari, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A. and Stevens, W.A. (1983) Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem. J.* 216:617-625.
59. Nicolson, G.L., Blanstein, J. and Elzker, M.E. (1974) Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry* 13:196-204.
60. Lambert, J.M., Senter, P.D., Yan-Young, A., Blattler, N.A. and Goldmacher, V.S. (1985) Purified immunotoxins that are reactive with human lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 260:12035-12041.
61. Barbieri, L., Aron, G.M., Irvin, J.D. and Stirpe, F. (1982) Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:111-119.

62. Lin, J.-Y., Lee, T.-Ch., and Tung, T.-Ch. (1982) Inhibitory effects of four isoabrisins on the growth of sarcoma 180 cells. *Cancer Res.* 42:276-279.
63. Maras, B., Ippoliti, R., De Luca, E., Lendaro, E., Belleli, A., Barra, D., Bossa, F. and Brunori, M. (1990) The amino acid sequence of a ribosome-inactivating protein from *Saponaia officinalis* seeds. *Biochem. Int.* 21:831-838.
64. Collins, E.J., Robertus, J.D., LoPresti, M., Stone, K.L., Williams, K.R., Wu, P., Hwang, K. and Piatak, M. (1990) Primary amino acid sequence of α -trichosanthin and molecular models for abrin A-chain and α -trichosanthin. *J. Biol. Chem.* 265:8665-8669.
65. Bolognesi, A., Barbieri, L., Abbondanza, A., Falasca, A.I., Carnicelli, D., Bettelli, M.G. and Stirpe, F. (1990) Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity suitable for immunotoxin preparation with RNA N-glycosidase from the seeds of *Momordica cochinchinesis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1087:293-302.
66. Bolognesi, A., Barbieri, L., Carnicelli, D., Abbondanza, A., Cenini, P., Falasca, A.I., Dinota, A. and Stirpe, F. (1989) Purification and properties of a new ribosome-inactivating protein with RNA N-glycosidase activity suitable for immunotoxin preparation from the seeds of *Momordica cochinchinesis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 993:287-292.
67. Butterworth, A.G. and Lord, J.M. (1983) Ricin and *Ricinus communis* agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor. *Eur. J. Biochem.* 137:57-65.
68. Barbieri, L., Zamboni, M., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S. and Stirpe, F. (1980) Inhibition of protein synthesis *in vitro* by proteins from seeds of *Momordica charantia* (bitter pear melon). *Biochem. J.* 186:443-452.
69. Blakey, D.C. and Thorpe, P.E. (1986) Effect of chemical deglycosylation on the *in vivo* fate of ricin A-chain. *Cancer Drug Delivery* 3:189-196.
70. Halling, K.C., Halling, A.C., Murray, E.E., Ladin, B.F., Houston, L.L. and Weaver, R.F. (1985) Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Res.* 13:8019-8033.
71. Olsnes, S. and Pihl, A. (1972) Ricin - A potent inhibitor of proteins synthesis. *FEBS Lett* (1972) 20:327-329.
72. Funatsu, G., Kimura, M. and Funatsu, M. (1979) Primary structure of Ala chain of ricin D. *Agric. Biol Chem.* 43:2221-2224.
73. Stillmark, H. (1889) en "Arbeiten des Pharmakologischen Institutes zur Dorpat, voi 3., Stuttgart, F. Enk. p. 59.
74. Olsnes, S. and Pihl, A. (1973) Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* 12:3121-3126.
75. Saltvedt, E. (1976) Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *Biochim. Biophys. Acta* 451:536-548
76. Cawley, D.B., Hedblom, M.L. and Houston, L.L. (1978) Homology between ricin and *Ricinus communis* agglutinin: amino terminal sequence analysis and synthesis inhibition studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 190:744-755.

77. Ready, M., Wilson, K., Piatak, M. and Robertus, J.D. (1984) Ricin-like plants toxin are evolutionarily related to single-chain ribosomes-inhibiting proteins from *Phytolacca*. J. Biol. Chem. 259:15252-15256.
78. Mise, T., Funatsu, G., Ishiguro, M. and Funatsu, M. (1977) Isolation and characterization of ricin E from Castor beans. Agric. Biol. Chem. 41:2041-2046.
79. Wei, Ch.H., Hartman, F.C., Pfuderer, P. and Yang, W.K. (1974) Purification and characterization of two major toxic proteins from seeds of *Abrus precatorius*. J. Biol. Chem. 249:3061-3067.
80. Habuka, N., Murakami, Y., Noma, M., Kudo, T. and Horikishi, K. (1989) Amino acid sequence of *Mirabilis* antiviral protein, total synthesis of its gene and expression in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264:6629-6637.
81. Ho, W.K., Liu, S.C., Shaw, P.C., Yeung, H.W., Ng, T.B. and Chan, W.Y. (1991) Cloning of the cDNA of alpha-momorcharin; a ribosome inactivating protein. Biochim. Biophys. Acta. 1088:311-314.
82. Montecucchi, P-C., Lazzarini, A. M., Barbieri, L., Stirpe, F., Soria, M and Lippi, D. (1989) N-terminal sequence of some ribosome-inactivating proteins. Int. J. Peptide Protein Res. 33: 263-267.
83. Bjorn, M.J., Larrick, J., Piatak, M. and Wilson, K.J. (1984) Characterization of translation inhibitors from *Phytolacca americana*. Amino-terminal sequence determination and antibody-inhibitory conjugates. Biochem. Biophys. Acta 790:154-163.
84. Falasca, A., Gasperi-Campani, A., Abbondanza, A., Barbieri, L. and Stirpe, F. (1982) Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Momordica charantia* inhibitor, and dianthins. Biochem. J. 207:505-509.
85. Ramakrishnan, S., Enghlid, J.J., Bryant, H.L. and Xu, F.J. (1989) Characterization of a translation inhibitory protein from *Luffa aegyptiaca*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:509-516.
86. Hegde, R. and Podder, S.K. (1992) Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin. Eur. J. Biochem. 204:155-164.
87. Xuejun, Z. and Jiahua, W. (1986) Homology of trichosanthin and ricin A chain. Nature 321:477-478.
88. Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. Ann. Rev. Biochem. 47:251-276.
89. Montfort, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Katzin, B., Rutenber, E., Young, N.H., Kamlin, R. and Robertus, J.D. (1987) The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. J. Biol. Chem. 262:5398-5403.
90. Rutenber, E., Ready, M. and Robertus, J.C. (1987) Structure and evolution of ricin B chain. Nature 326:385-394.
91. Ramakrishnan, S., Bjorn, M.J. and Houston, L.L. (1989) Recombinant Ricin A chain conjugated to monoclonal antibodies: Improved tumor cell inhibition in the presence of lysosomotropic compounds. Cancer Res. 49:613-617.
92. Gsang, M.S., Russell, D.W., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1987) Cloning and expression of recombinant functional ricin B chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5640-5644.

93. Richardson, P.I., Roberts, L.M., Gould, J.H. and Lord, J.M. (1988) The expression of functional ricin B-chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 950:385-394.
94. Robertus, J.D., Piatak, M., Ferris, R. and Houston, L.L. (1987) Crystallization of ricin A chain obtained from a cloned gene expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262:19-20.
95. Villafranca, J.E. and Robertus, J.D. (1981) Nucleotide sequence of ricin. *J. Biol. Chem.* 257:554-556.
96. Lamb, F.I., Robertus, L.M. and Lord, J.M. (1985) Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. *Eur. J. Biochem.* 148:265-270.
97. Wood, K.A., Lord, J.M., Wawrzynczak, E.J. and Piatak, M. (1991) Preproabrin: genomic cloning, characterization and the expression of the A-chain in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 198:723-732.
98. Legname, G., Bellosta, P., Gromo, G., Modena, D., Keen, J.N., Roberts, L.M. and Lord, J.M. (1991) Nucleotide sequence of cDNA coding for dianthin 30, a ribosome inactivating protein from *Dyanthus caryophyllus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1090:119-122.
99. Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H. and Waring, M.J. (1981) en "The molecular Basis of Antibiotic Actions" 2nd Ed., John Wiley and sons, Ed. New York, USA, pp. 402-457.
100. Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. and Tsuguri, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxin lectins on eukariotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262:5908-5912.
101. Mitchell, S.J., Hedblom, M., Cawley, D. and Houston, L.L. (1976) Ricin does not act as an endonuclease on L cell polysomal RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68:763-769.
102. Endo, Y., Oka, T., Tsurugi, K. and Frank, H. (1989) The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.* 248:115-118.
103. Olsnes, S. (1987) Closing in on ricin action. *Nature* 328:474-475.
104. Obrig, T.G., Moran, T.P. and Brown, J.E. (1987) The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukariotic protein synthesis. *Biochem. J.* 244:287-294.
105. Hartley, M.R., Legname, G., Osborn, R., Chen, Z. and Lord, J.M. (1991) Single-chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *FEBS Lett.* 290:65-68.
106. Reisbig, R., Olsnes, S. and Eiklid, K. (1981) The cytotoxic activity of *Shigella toxin*. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 256:8739-8744.
107. Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T. and Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* 171:45-50.
108. Calderwood, S.B., Auclair, F., Donohue-Rolfe, A. Keusch, G.T. and Mekalanos, J.J. (1987) Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5397-5405.

109. Kawata, Y., Sakiyama, F. and Tamaoki, H. (1988) Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem. 176:683-697.
110. Sato, S. and Uchida, T. (1975) Aminoacid sequences of two base non-specific and adenylic acid preferential ribonucleases from *Aspergillus saitoi* and *Trichoderma viride*. Biochem. J. 145:353-360.
111. Egami, F. and Nakamura, K. (1969) en "Microbial ribonuclease", Springer Verlag. Ed., Berlin, Alemania. pp. 452-456.
112. Fodstad, O., Olsnes, S. and Pihl, A. (1977) Inhibitory effect of abrin and ricin on the growth of transplantable murine tumors and of abrin on human cancers in nude mice. Cancer Res. 37:4559-4567.
113. Fodstad, O. and Pihl, A. (1978) Effect of abrin and ricin on survival of L1210 leukemic mice and on leukemic and normal bone marrow cells. Int. J. Cancer 22:558-563.
114. Fodstad, O., Aass, N. and Pihl, A. (1980) Response to chemotherapy of human malignant melanoma xenografts in athymic nude mice. Int. J. Cancer 25:453-458.
115. Kishida, K., Masuho, Y. and Hara, T. (1983) Protein-synthesis inhibitory protein from seeds of *Luffa cylindrica roem*. FEBS Lett. 153:209-212.
116. Aron, G.M. and Irvin, J.D. (1980) Inhibition of Herpes simplex virus multiplication by the Pokeweed antiviral protein. Antimicrob. Agents Chemother. 17:1032-1033.
117. Spreafico, F., Malfiore, C. Moras, M.L., Marmoti, L., Filippeschi, S., Barbieri, L., Perocco, P and Stirpe, F. (1983) Toxicity of Pokeweed antiviral protein for human normal macrophages. Int. J. Immunopharmacol. 5:335-344.
118. Licastro, F., Franceschi, C., Barbieri, L. and Stirpe, F. (1980) Toxicity of *Momordica charantia* lectin and inhibitor for human normal and leukaemic lymphocytes. Virchows Arch. B Cell Pathology. 33:257-265.
119. Barbieri, L., Zamboni, M., Montanaro, L., Sperti, S. and Stirpe, F. (1980) Purification and properties of different forms of modeccin, the toxin of *Adenia digitata*. Biochem. J. 185:203-210.
120. Fodstad, O., Olsnes, S. and Pihl, A. (1976) Toxicity, distribution and elimination of the cancerostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. Br. J. Cancer 34:418-425.
121. Mendelsohn, J. (1991) Immunotoxins: prospects and problems. J. Clin. Oncol. 12:2088-2090.
122. Ramakrishnan, S. and Houston, L.L. (1985) Immunological and biological stability of immunotoxins *in vivo* as studied by the clearance of disulfide-linked pokeweed antiviral protein-antibody conjugates from blood. Cancer Res. 45:2031-2036.
123. Olsnes, S., Reisbig, R. and Eiklid, K. (1981) Anticancer properties of the toxin of *Diphtheria*. J. Biol. Chem. 256:8732-8738.
124. Olsnes, S., Sanvig, K., Petersen, O.W. and van Deurs, B. (1989) Immunotoxins entry into cells and mechanisms of action. Immunol. Today 10:291-295.
125. Freeman, V.J. (1951) Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bacteriol. 61:675-688.

126. Pappenheimer, A.M., Jr. and Gill, D.M. (1973) Diphtheria. Recent studies have clarified the molecular mechanisms involved in its pathogenesis. *Science* 182:353-358.
127. Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M.G., Kantardjeff, K.A., Collier, R.J. and Eisenberg, D. (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357:216-222.
128. Kandel, J., Collier, R.J. and Chung, D.W. (1974) Quantal entry of diphtheria toxin to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 249:2088-2097.
129. Tweten, R.K., Barbieri, J.T. and Collier, R.J. (1985) Diphtheria toxin. Effect of substituting aspartic acid for glutamic acid 148 on ADP-ribosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 260:10392-10394.
130. Chang, M.P., Baldwin, R.L., Bruce, C. and Wisnieski, B.J. (1989) Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. *Science* 246:1165-1168.
131. Nakamura, L.T. and Wisnieski, B.J. (1990) Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 265:5237-5241.
132. Leppla, S.H., Martin, O.C. and Muehl, L.A. (1978) The exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*: a proenzyme having an unusual mode of activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81:532-538.
133. Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F. and McKay, D.B. (1986) Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:1320-1324.
134. Pastan, I. and FitzGerald, D. (1989) *Pseudomonas* exotoxin: chimeric toxins. *J. Biol. Chem.* 264:15157-15160.
135. Siegall, C.B., Chaudhary, V.K., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1989) Functional analysis of domains II, Ib, and III of *Pseudomonas* exotoxin. *J. Biol. Chem.* 264:14256-14261.
136. Pai, L.H., Bookman, M.A., Ozols, R.F., Young, R.C., Smith, J.W., II, Longo, D.L., Gould, B., Frankel, A., McClay, E.F., Howell, S., Reed, E., Willingham, M.C., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1991) Clinical evaluation of intraperitoneal *Pseudomonas* exotoxin immunoconjugate OVB3-PE in patients with ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 9:2095-2103.
137. Donohue-Rolfe, A., Acheson, D.W.K. and Keusch, G.T. (1991) Shiga toxin: purification, structure and function. *Rev. Infect. Dis.* 13(suppl 4):S293-297.
138. Iglewski, B.H. and Sadoff, J.C. (1979) Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A:adenosine-ribosylation of mammalian elongation factor 2 *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol.* 60:353-361.
139. Kessel, M. and Klink, F. (1980) Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Nature* 287:250-251.
140. Vázquez, D. (1985) Cell evolution and the selective action of translation inhibitors en "Mechanisms of proteins synthesis". E. Bermek Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio pp. 201-210.
141. Olshes, S. and Sandving, K. (1988) How protein toxins enter and kill cells en "Immunotoxins", Ed. A.E. Fankel, Academic Press, Orlando, USA pp. 39-73.
142. Lindberg A.A., Brown, E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E. and Karlsson, K-L. (1987) Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Biol. Chem.* 262:1774-1785.

143. Mekada, E., Okada, Y. and Uchida, I. (1988) Methylamine stimulates the action of ricin toxin, but inhibits that of diphtheria toxin. *J. Cell Biol.* 107:511-519.
144. Cieplak, W., Gaudin, H.M. and Eidels, L. (1987) Diphtheria toxin receptor. Identification of specific diphtheria toxin-binding proteins on surface of Vero and BS-C-1 cells. *J. Biol. Chem.* 262:13246-13253.
145. Greenfield, L., Johnson, V.G. and Youle, R.J. (1987) Mutational diphtheria toxin separate binding from entry and amplify immunotoxin selectivity. *Science* 238:536-539.
146. Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, A. and Keusch, G.T. (1986) Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J. Exp. Med.* 163:1391-1404.
147. Jinno, Y., Chaudhary, V.K., Kondo, T., Adhya, S., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1988) Mutational analysis of domain I of *Pseudomonas* exotoxin which reduce cell binding and animal toxicity. *J. Biol. Chem.* 263:13203-13207.
148. Morris, R.E., Gerstein, A.S., Bonventre, P.F. and Saelinger, C.B. (1985) Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infect. Immun.* 50:721-727.
149. Sandvig, K., Olsnes, S., Petersen, O.W. and van Deurs, B. (1987) Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J. Cell Biol.* 105: 679-689.
150. McIntosh, D., Timar, J. and Davies, A.J. (1990) The intracellular movement and cycling of ricin. *Eur. J. Cell. Biol.* 52:77-86.
151. Timar, J., McIntosh, D.P., Henry, R., Cumber, A.J., Parnell, G.D. and Davies, A.J.S. (1991) The effect of ricin B chain on the intracellular trafficking of an A chain immunotoxin. *Br. J. Cancer* 64:655-662.
152. Montecucco, C., Papini, E., Schiavo, G., Rappuoli, R. and Tomasi, M. (1988) Studies on the insertion of diphtheria toxin into biological membranes in "Bacterial Protein Toxins". Fehrehbach Eds. Gustav Fischer, N.Y., USA, pp. 287-294.
153. Ogata, M., Chaudhary, V.K., Pastan, I. and FitzGerald, D.J. (1990) Processing of *Pseudomonas* exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 265:20678-20685.
154. Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S. and Pihl, A. (1982) Action of Viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J. Biol. Chem.* 257:13271-13277.
155. Sandvig, K., and Olsnes, S. (1982) Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin, and diphtheria toxin into cells. I. Requirement for calcium. *J. Biol. Chem.* 257:7495-7503.
156. Youle, R.J. and Colombatti, M. (1987) Hybridoma cells containing intracellular anti-ricin antibodies show ricin meets secretory antibody before entering the cytosol. *J. Biol. Chem.* 262:4676-4682.
157. van Deurs, B., Sandvig, K., Petersen, O.W., Olsnes, S., Simons, K. and Griffiths, G. (1988) Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 106:153-163.

158. Hudson, T.H. and Grillo, F.G. (1991) Brefeldin-A enhancement of ricin A-chain immunotoxins and blockade of intact ricin, modeccin, and abrin. *J. Biol. Chem.* 266:18586-18592.
159. Olsnes, S., Moskaug, J.O., Stenmark, H. and Sandvig, K. (1988) Diphtheria toxin entry: protein translocation in the reverse direction. *Trends Biochem. Sci.* 13:348-351.
160. Moskaug, J.O., Sandvig, K. and Olsnes, S. (1988) Low pH-induced release of diphtheria toxin A-fragment in Vero cells. Biochemical evidence for transfer to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 263:2518-2525.
161. Micheli, P.A. (1729) en "Nova Plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. Ed. Illus. Florencia, Italia. pp. 234.
162. Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1977) en "The genus *Aspergillus*". Ed. Robert E. Krieger Publishing Company Inc, Florida, USA.
163. Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. and Sussman, A.S. (1973) en "The Fungi, An advanced treatise", Volumen IVA: "A taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti". Ed. Academic Press Inc., Londres, Inglaterra.
164. Ceruti, A. and Ceruti, M. (1989) en "Funghi, Cancerogeni e anticancerigeni dell'ambiente, degli alimenti, degli mangini, Musumeci Editore, Italy. pp. 23-171.
165. Klein, R. (1944) Development studies in the fungi. I. The foot-cell in *Aspergillus clavatus*. *Desm. Brit. Mycol. Soc. Trans.* 27:121-130.
166. Czapek, F. (1902) Untersuchungen über die stickstoff gewinnung und Eiweiss-bildung der Pflanzen. *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.* 1:540-560.
167. Czapek, F. (1903) Untersuchungen über die stickstoff gewinnung und Eiweiss-bildung der Pflanzen. *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.* 3:47-66.
168. Dox, A.W. (1910) The intracellular enzymes of *Penicillium* and *Aspergillus* with special reference to those of *P. camemberti*. U.S. Dept. Agr. Bur. Animal Ind. Bull. N°. 120. pp. 170.
169. Blakeslee, A.F. (1915) Lindner's roll tube method of separating cultures. *Phytopathology*, 5:68-69.
170. Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A.E., Fox, J.W. and Chapman, M.D. (1990) *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J. Exp. Med.* 172:1529-1532.
171. Fratafico, P.M. and Buckley, H.R. (1991) Identification and characterization of an immunodominant 58-kilodalton antigen of *Aspergillus fumigatus* recognized by sera of patients with invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* 59:309-315.
172. Van Brunt, J. (1986) Fungi: the perfect hosts? *Bio/Technology* 4:1057-1062.
173. Arbige, M.V. and Ritcher, W.H. (1989) Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends Biotechnol.* 7:330-335.
174. Archer, D.B., Jeenes, D.J., Mackenzie, D.A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., Radford, S.E. and Dobson, S.M. (1990) HenEGG white lysozyme expressed and secreted from *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. *Bio/Technology* 8:741-745.
175. Ballance, H. and Turner, G. (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* 36: 321-331.

176. Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J.R., van der Hondel, C.A.M.J.J. and Fiers, W. (1991) Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Bio/Technology* 9:378-381.
177. Lamy, B. and Davies, J. (1991) Isolation and nucleotide sequence of the *Aspergillus restrictus* gene coding for the ribonucleolytic toxin restrictocin and its expression in *Aspergillus nidulans*: the leader sequence protects producing strains from suicide. *Nucleic Acids Res.* 19:1001-1006.
178. Smith, G., (1931) The identification of fungi causing mildew in cotton goods. The genus *Aspergillus*. Part II. *J. Textil. Inst.* 22:110-116.
179. Roga, V., Hedeman, L.P. and Olson, B.H. (1971) Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms. *Cancer Chemother. Rep.* 55:101-113.
180. Wehmer, C. (1901) Die Pilzgattung *Aspergillus* in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. *Mém. soc. phys. his. nat. Genève.* 33:1-157.
181. Blochwitz, A. (1929) Die gattung *Aspergillus*. Neue spezies. *Diagnosen. Synonyme. Ann. Mycol.* 27:205-240.
182. Philpot, F.J. (1943) A penicillim-like substance from *Aspergillus giganteus*. *Nature* 152:282.
183. Wilkins, W.H. and Harris, G.C.M. (1942) Investigations into the production of bacteriostatic substances by fungi. I. Preliminary examination of 100 fungal species. *Brit. J. Explit. Pathol.* 23:166.
184. Huls, R., Ramaut, J. and Huvelle, R. (1957) Observations on a culture of *Aspergillus giganteus* Wehmer. *Irsarc. Collection. Bull. classe aci. Acad. roy. Belg.* 48:801-817.
185. Pinck, L.A. and Allison, F.E. (1944) The synthesis of lignin-like complexes by fungi. *Soil Sci.* 57:155-161.
186. Donin, M.N., Fried, J. and Thoma, R.W. (1960) Steroid synthesis by *Aspergillus giganteus*. U.S. Patent No. 2960435.
187. Muñoz, S.M., Caldera, M., Canevari, S., Tossi, E., Cogliati, T., Colnaghi, M.I. and Conde, F.P. (1990) Fractionation of the ribosome inactivating protein preparations with triazine dyes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:554-560.
188. Orlandi, R., Canevari, S., Conde, F.P., Leoni, F., Mezzananza, D., Ripamonti, M., and Colnaghi, M.I. (1988) Immunoconjugates generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAb. *Cancer Immunol. Immunother.* 26:114-120.
189. Wawrzyniczak, E.J., Henry, R.V., Cumber, A.J., Parnell, G.D., Derbyshire, E.J. and Ulbrich, N. (1991) Biochemical cytotoxic and pharmacokinetic properties of an immunotoxin composed of a mouse monoclonal antibody Fib75 and the ribosome-inactivating protein α -sarcin from *Aspergillus giganteus*. *Eur. J. Biochem.* 196:203-209.
190. Olson, B.H. (1963) Process for the production of alphasarcin by *Aspergillus giganteus* and resulting product. U.S. Patent No. 3104204.
191. Olson, B.H. and Goerner, G.L. (1966) Process for the production of regulin by *Aspergillus restrictus* and resulting product. U.S. Patent No. 3230153.
192. Miller, S.P. and Bodley, J. W. (1988) The ribosomes of *Aspergillus giganteus* are sensitive to the cytotoxic action of α -sarcin. *FEBS Lett.* 221:188-190.

193. Sacco, G., Drickamer, K. and Wool, I.G. (1983) The primary structure of the cytotoxin α -sarcin. *J. Biol. Chem.* 258: 5811-5818.
194. López-Otín, C., Barber, D., Fernandez-Luna, J.L., Soriano, F. and Méndez, E. (1984) The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur. J. Biochem.* 143:621-634.
195. Fernandez-Luna, J.L., López-Otín, C., Soriano, F. and Méndez, E. (1985) Complete amino acid sequence of the *Aspergillus* cytotoxin mitogillin. *Biochemistry* 24:861-867.
196. Gavilanes, J.G., Vázquez, D., Soriano, F. and Méndez, E. (1983) Chemical and spectroscopic evidence on the homology of three antitumor proteins: α -sarcin, mitogillin and restrictocin. *J. Prot. Chem.* 2:251-261.
197. Chen, Y.H., Yang, J.T. and Chou, K.H. (1974) Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* 13:3350-3359.
198. Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1988) Conformational study of the antitumor protein α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* 953:280-288.
199. Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
200. Conde, F.P., Fernández-Puentes, C., Montero, M.T.V. and Vazquez, D. (1978) Protein toxins that catalytically inactivate ribosomes from eukaryotic microorganism. Studies on the mode of action of α sarcin, mitogillin and restrictocin: response to α sarcin antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* 4:349-355.
201. Martínez, S.E. and Smith, J.L. (1991) Crystallization and preliminary characterization of mitogillin, a ribosomal ribonuclease from *Aspergillus restrictus*. *J. Mol. Biol.* 218:489-492.
202. Schindler, D. and Davies, J. (1977) Specific cleavage of ribosomal RNA caused by α sarcin. *Nucleic Acids Res.* 4: 1097-1100.
203. Hobden, A.N. and Cundliffe, E. (1978) The mode of action of α sarcin and a novel assay of the puromycin reaction. *Biochem. J.* 170:57-61.
204. Fando, J.L., Alaba, I., Escarmis, C., Fernandez-Luna, J.L., Méndez, E. and Salinas, M. (1985) The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur. J. Biochem.* 149:29-34.
205. Endo, Y., Huber, P.W. and Wool, I.G. (1983) The ribonuclease activity of the cytotoxin α -sarcin. *J. Biol. Chem.* 258:2662-2667.
206. Georgiev, O.I., Nikolaev, N., Hadjiolov, A.A., Skryabin, K.G., Zakharyev, V.M. and Bayev, A.A. (1981) The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 9:6953-6958.
207. Wool, I.G. (1984) The mechanism of action of the cytotoxic nuclease α -sarcin and its use to analyse ribosome structure. *Trends Biochem. Sci.* 9:14-17.
208. Hausner, T-P., Atmadja, J. and Nierhaus, K.H. (1987) Evidence that the G2661 region of 23S rRNA is located at the ribosomal binding sites of both elongation factors. *Biochim. Biophys. Acta* 911:423.

209. Sanz, J.L. and Amils, R. (1984) Sensitivity of thermoacidophilic archaebacteria to α -sarcin. *FEBS Lett.* 171:63-66.
210. Maly, P. and Brimacombe, R. (1983) Complete sequence of *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 11:7263-7286.
211. Leffers, H., Egebjerg, J., Andersen, A., Christensen, T. and Garrett, R.A. (1988) Domain VI of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA structure, assembly and function. *J. Mol. Biol.* 204:507-522.
212. Garrett, R.A., Christensen, A. and Douthwaite, S. (1984) Higher-order structure in the 3'-terminal domain VI of the 23 S ribosomal RNAs from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* 179:689-712.
213. Ackerman, E.J., Saxena, S.K. and Ulbrich, N. (1988) α -sarcin causes a specific cut in 28S rRNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 263:17076-17083.
214. Miller, S.P. and Bodley, J.W. (1988) α -sarcin cleaves ribosomal RNA at the α -sarcin site in the absence of ribosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154:404-410.
215. Endo, Y., Chan, Y-L., Lin, A., Tsurugi, K. and Wool, I.G. (1988) The cytotoxins α -sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-Mer) that mimics a region of 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 263:7917-7920.
216. Saxena, S.K. and Ackerman, E.J. (1990) Microinjected oligonucleotides complementary to the α -sarcin loop of 28 S RNA abolish proteins synthesis in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265:3363-3369.
217. Endo, Y., Glück, A. and Wool, I.G. (1991) Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* 221:193-207.
218. Paleologue, A., Reboud, J.P. and Reboud, A.M. (1986) Modifications of 60 S ribosomal subunits induced by the ricin A chain. *FEBS Lett.* 208:373-378.
219. Cawley, D.B., Hedbolm, M.L. and Houston, L.L. (1979) Modifications of eukaryotic ribosomes induced by the ricin and related toxins. *Biochemistry* 18:2648-2654.
220. Walker, T.A., Endo, Y., Wheat, W.H., Wool, I.G. and Pace, N.R. (1983) Study of the effects of α -sarcin and ricin in the interactions between 28 S and 5.8 S rRNAs. *J. Biol. Chem.* 258:333-338.
221. Terao, K., Uchiumi, T., Endo, Y. and Ogata, K. (1988) Ricin and α -sarcin alter the conformation of 60S ribosomal subunits at neighboring but different sites. *Eur. J. Biochem.* 174:459-463.
222. Moazed, D., Robertson, J.M. and Noller, H.F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* 334:362-364.
223. Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L. and Sperti, S. (1989) Effect of α -sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* 257:723-727.
224. Miller, S.P. and Bodley, J.W. (1991) α -sarcin cleavage of ribosomal RNA is inhibited by the binding of elongation factor G or thiostrepton to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* 19:1667-1680.

225. Fernández-Puentes, C. and Carrasco, L. (1980) Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* 20:769-775.
226. Alonso, M.A. (1980) en "Regulación de la síntesis de proteínas en células humanas infectadas por picornavirus". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
227. González, M.E., Alarcón, B. and Carrasco, L. (1987) Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1388-1393.
228. Fernandez-Puentes, C. and Vázquez, D. (1977) The inhibition of cell functions after viral infection. A proposed general mechanism. *FEBS Lett.* 78:143-146.
229. Vázquez, D. (1978) Inhibitors of protein biosynthesis en "Antibiotics" Vol V, ed. Hohn, F.E., Springer -Verlag, Heidelberg, Alemania. pp. 172-176.
230. Otero, M.J. and Carrasco, L. (1986) External ATP permeabilizes transformed cells to macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134:453-460.
231. Otero, M.J. and Carrasco, L. (1988) Exogenous phospholipase C permeabilizes mammalian cells to proteins. *Exp. Cell. Res.* 177:154-161.
232. García Juberías, M. (1986) en "Citotoxinas de *Aspergillus*: Purificación de la alfasarcina". Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
233. Almela, M.J., González, M.E. and Carrasco, L. (1991) Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. *J. Virol.* 65:2572-2577.
234. Castanys, S., Gamarro, F., Pérez-Ruiz, L.M. and Osuna, A. (1990) Purification of a glycoprotein excreted by *Trypanosoma cruzi* to increase the permeability of the host-cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:736-742.
235. Canevari, S., Orlandi, R., Ripamonti, M., Mezzanzanica, P., Conde, F. and Colnaghi, M.I. (1986) Immunotoxins generated with restrictocin. *J. Cell. Biochem.* 10b:77.
236. Gasset, M., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1989) Study of the interaction between the antitumour protein α -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.* 258:569-575.
237. Gasset, M., Oñaderra, M., Thomas, P.G. and Gavilanes, J.G. (1990) Fusion of phospholipid vesicles produced by the antitumour protein α -sarcin. *Biochem. J.* 265:815-822.
238. Gasset, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A., Schiavo, G-P., Laynez, J., Usobiaga, P. and Gavilanes, J.G. (1991) Effect of the antitumor protein α -sarcin on the thermotropic behaviour of acid phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1068:9-16.
239. Gasset, M., Oñaderra, M., Goormaghtigh, E. and Gavilanes, J.G. (1991) Acid phospholipid vesicles produce conformational changes on the antitumor protein α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* 1080:51-58.
240. Blewitt, M.G., Chung, L.A. and London, E. (1985) Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochemistry*, 24:5458-5464.
241. Papini, F., Colonna, R., Cusinato, F., Montecucco, C., Tomasi, M. and Rappuoli, R. (1987) Lipid interaction of diphtheria toxin and mutants with altered fragment B.I. Liposome aggregation and fusion. *Eur. J. Biochem.* 169:629-635.

242. Cabiaux, V., Lorge, P., Vandenbraden, M., Falmagne, P. and Ruyschaert, J.M. (1985) Tetanus toxin induces fusion and aggregation of lipid vesicles containing phosphatidylinositol at low pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:840-849.
243. Oka, T., Natori, Y., Tanaka, S., Tsurugi, K. and Endo, Y. (1990) Complete nucleotide sequence of cDNA for the cytotoxin alpha sarcin. *Nucleic Acids Res.* 18:1897.
244. Henze, P.-P.C., Hahn, U., Erdmann, V.A. and Ulbrich, N. (1990) Expression of the chemically synthesized coding region for the cytotoxins α -sarcin in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur. J. Biochem.* 192:127-131.
245. Huber, P.W. and Wool, I.G. (1984) Identification of the binding site on 5S rRNA for the transcription factor IIIA: proposed structure of a common binding site on S rRNA and on the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:322-326.
246. Parker, K.A., Bruzik, J.D. and Steitz, J.A. (1988) An *in vitro* interaction between the human U3 snRNP and 28S rRNA sequences near the α -sarcin site. *Nucleic Acids Res.* 16:10493-10509.
247. Siegel, V. and Walter, P. (1988) Binding sites of the 19-kDa and 68/72-kDa signal recognition particle (SRP) proteins on SRP RNA as determined by protein-RNA "footprinting". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85:1801-1805.
248. Huber, P.W. and Wool, I.G. (1988) Use of α -sarcin to analyze ribosomal RNA-protein interactions. *Methods Enzymol.* 164:468-475.
249. Pelka, H. and Schulman, L.H. (1986) Study of the interaction of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase with tRNA^{fMet} using chemical and enzymatic probes. *25:4450-4456.*
250. Carrasco, L. (1981) Modification of membrane permeability induced by animal viruses early in infection. *Virology* 113:623-629.
251. Mariani, G., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B. (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
252. Conde, F.P., Oriandi, R., Canevari, S., Mezzanzanica, D., Ripamonti, M., Muñoz, S.M., Jorge, P. and Coinaghi, M.I. (1989) The *Aspergillus* toxin restrictocin is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugate with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* 178:795-802.
253. Flavell, D.J., Cooper, S., Morland, B. and Flavell, S.U. (1991) Characteristics and performance of a biespecific F(ab')₂ antibody for delivering saporin to a CD4⁺ human acute T-cell leukaemia cell line. *Br. J. Cancer* 64:274-280.
254. Ghetie, V., Till, M.A., Ghetie, M.A., Tucker, T., Porter, J., Patzer, E.J., Richardson, J.A., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1990) Preparation and characterization of conjugates of recombinant CD4 and deglycosylated ricin A chain using different cross-linkers. *Bioconjug. Chem.* 1:24-31.
255. Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, V.V., Tischenko, G.N., Polyakov, K.M. and Pavlovsky, A.G. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends Biochem. Sci.* 8:364-369.
256. Sevcik, J., Sanishvili, R.G., Pavlovsky, A.G. and Polyakov, K.M. (1990) Comparison of active sites of some microbial ribonucleases: structural basis for quaternary specificity. *Trends Biochem. Sci.* 15:159-161.

257. Iakunashi, K. and Hashimoto, J. (1988) The amino acid sequence of Ribonuclease U1, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.*, 103:313-320.
258. Heinemann, U. and Saenger, W. (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T₁-2'-guanylic acid complex: an X-ray study. *Nature* 299:27-31.
259. Takahashi, K. (1988) The amino acid sequence of ribonuclease N1, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Neurospora crassa*. *J. Biochem.* 104:375-382.
260. Yakovlev, G.I., Moiseyev, G.P., Bezborodova, S.I., Both, V. and Sevcik, J. (1992) A comparative study on the catalytic properties of guanyl-specific ribonucleases. *Eur. J. Biochem.* 204:187-190.
261. Rico, M., Bruix, M., Santoro, J., Neira, J.L., González, C., Nieto, J.L. and Herranz, J. (1989) Two dimensional ¹H NMR studies of the solution structure of RNase A-pyrimidine-nucleotide complexes. *Eur. J. Biochem.* 183:623-638.
262. Cuchillo, C.M., de Llorens, R., Nogués, M.V. and Parés, X. (1991) en "Structure, Mechanism and Function of Ribonucleases". Proceedings of the 2nd International Meeting held in Sant Feliu de Guíxols. IBF Publications Universitat Autònoma de Barcelona.
263. Parés, X., Nogués, M.V., de Llorens, R. and Cuchillo, C.M. (1991) Structure and function of ribonuclease A binding subsites en "Essays in Biochemistry" Vol. 26, edited by K.F. Tipton, Portland Press Ltd. London U.K. pp. 89-103.
264. Prior, T.I., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1992) Translation mediated by domain II of *Pseudomonas* exotoxin A; transport of barnase into the cytosol. *Biochemistry* 31:3555-3559.
265. Leoni, F., Magnani, J.L., Miotti, S., Canevari, S., Pasquali, M., Sonnino, S. and Colnaghi, M.I. (1988) The antitumor monoclonal antibody MOv2 recognizes the Lewis A hapten. *Hybridoma* 7:129-139.
266. Agresti, R., Alzani, R., Andreola, S., Bedini, V., Giani, S., Ménard, S., Rilke, F. and Colnaghi, M.I. (1988) Histopathological characterization of a novel monoclonal antibody, MLUC1, reacting with lung carcinomas. *Tumori* 74:401-410.
267. Ripamonti, M., Canevari, S., Buraggi, G., Gadina, M., Turrin, A., Gasparini, M., Scassellati, G. and Colnaghi, M.I. (1988) Monoclonal anti-CEA antibody factors affecting localization in a preclinical study. *The International Journal of Biological Markers* 3:249-258.
268. Gilliland, D.G., Steplewski, Z., Collier, R.J., Mitchell, K.F., Chang, T.H. and Koprowski, H. (1980) Antibody directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4539-4543.
269. Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H. and Schlossman, S.F. (1980) A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature (Lond)* 283:583-585.
270. Krollick, K.A., Villemez, C., Isakson, P., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1980) Selective killing of normal or neoplastic B-cells by antibodies coupled to the A chain of α -B₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5419-5423.

271. Raso, V., Ritz, J., Basala, M. and Schlossman, S.F. (1982) Monoclonal antibody-ricin A chain conjugate selectively cytotoxic for cells bearing the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *Cancer Res.* 42:457-464.
272. Pierotti, M.A., Miotti, S., Della Torre, G., Parmiani, G. and Della Porta, G., (1979) Preparation of antigenically active membranes from solid murine lymphomas and fibrosarcomas. *J. Immunol. Methods* 27:145-158.
273. Jett, M., Seed, T.M. and Jamieson, G.A. (1977) Isolation and characterization of plasma membranes and intact nuclei from lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 44:80-93.
274. Magnani, J.L., Spitalnik, S.L. and Ginsburg, V. (1987) Antibodies against cell surface carbohydrates: determination of antigen structure. *Methods Enzymol.* 138:484-491.
275. Feizi, T. (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314:53-57.
276. Miotti, S., Canevari, S., Ménard, S., Mezzanzanica, D., Porro, G., Pupa, S.M., Regazzoni, M., Tagliabue, E. and Colnaghi, M.I. (1987) Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. *Int. J. Cancer* 39:297-303.
277. Feizi, T. and Childs, R.A. (1987) Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem. J.* 245:1-11.
278. Gold, P. and Freedman, S.O. (1965) Presence of carbohydrates in the cellular surface. *J. Exp. Med.* 121:439-462.
279. Bergstrand, C.G. and Czar, B. (1956) Purification of alpha-fetoprotein. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 8:174.
280. Schreiber, H. (1989) en "Fundamental Immunology". W.E. Paul editor, 2^a edición. Ed. Raven Press. Nueva York, USA. pp. 931-932.
281. Weil-Hillman, G., Runge, W., Jansen, F.K. and Valleria, D.A. (1985) Cytotoxic effect of anti-Mr 67,000 protein immunotoxins on human tumors in a nude mouse model. *Cancer Res.* 45:1328-1336.
282. Engert, A., Martin, G., Amlot, P., Wijdenes, J., Drenth, V. and Thorpe, P. (1991) Immunotoxins constructed with anti-CD25 monoclonal antibodies and deglycosylated ricin A-chain have potent anti-tumour effects against human Hodgkin cells in vitro and solid Hodgkin tumours in mice. *Int. J. Cancer* 49:450-455.
283. Blazar, B.R., Carroll, S.F. and Valleria, D.A. (1991) Prevention of murine graft-versus-host disease and bone marrow allograftment across the major histocompatibility barrier after donor graft preincubation with anti-LFA1 immunotoxin. *Blood* 78:3093-3102.
284. Cawley, D.B., Herschman, H.R., Gilliland, D.G. and Collier, R.J. (1980) Epidermal Growth Factor-toxin A chain conjugates: EGF-ricin A is a potent toxin while EGF-diphtheria fragment A is nontoxic. *Cell* 22:563-570.
285. Kaplan, G., Cohn, Z.A. and Smith, F.A. (1992) Rational immunotherapy with interleukin 2. *Bio/Technology* 10:157-162.
286. Stratton, M.R. (1992) The p53 gene in human cancer. *Eur. J. Cancer* 28:293-295.
287. Bandmann, J., Hung, M.-C. and Weinberg, R.A. (1986) The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 321:526-529.

288. Gusterson, B.A. (1992) Identification and interpretation of Epidermal Growth Factor and c-erb B-2 overexpression. *Eur. J. Cancer* 28:263-267.
289. Ménard, S., Canevari, S., Casalini, P., Da Dalt, M.G., Mezzanzanica, D. and Colnaghi, M.I. (1989) Scatchard plot analysis for the evaluation of the monoclonal antibody affinity constant for cellular antigens: a "constant" which varies with the epitope. *J. Immunol. Res.* 1:155-161.
290. Peterson, J.A., Ceriani, R.L., Blank, E.W. and Osvaldo, L. (1983) Comparison of rates of phenotypic variability in surface antigen expression in normal and cancerous human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 43:4291-4296.
291. Heppner, G.H. (1984) Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 44:2259-1165.
292. Katz, F.E., Janossy, G., Cumber, A., Ross, W., Blacklock, H.A., Tax, W. and Thorpe, P.E. (1987) Elimination of T cells from human peripheral blood and bone marrow using a cocktail of three anti-T cell immunotoxins. *Br. J. Haematol.* 67:407-411.
293. Mezzanzanica, D., Canevari, S., Casalini, P., Della Torre, G. and Colnaghi, M.I. (1989) Monoclonal antibodies in cancer therapy: selection of most appropriate reagent for different approaches. en "Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy", Alan R. Lis, Inc. pp. 181-190.
294. Matzku, S., Broecker, E.-B., Brügger, J., Dippold, W.G. and Tilgen, W. (1986) Modes of binding and internalization of monoclonal antibodies to human melanoma cell lines. *Cancer Res.* 46: 3848-3854.
295. Vitetta, E.S., Stone, M., Amlot, P., Fay, J., May, R., Till, M., Newman, J., Clark, P., Collins, R., Cunningham, D., Ghetie, V., Uhr, J.W. and Thorpe, P.E. (1991) Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 51:4052-4058.
296. Cobb, L.M. (1990) Intratumoral factors influencing the access of macromolecules to tumor cells. en "Targetting of Drugs" Ed. G. Gregoriadis, Plenum Press, Nueva York, USA.
297. Jain, R.K. (1989) Access of macromolecules to solid tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:570-576.
298. Dyer, M.J.S. (1992) Antibody therapy of malignancy. *Eur. J. Cancer* 28:276-280.
299. Dyer, M.J.S., Hale, G., Hayhoe, F.G.J. and Waldmann, H. (1989) Effects of CAMPATH-1 antibodies *in vivo* in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood* 73:1431-1439.
300. Raso, V. and Griffin, T. (1980) Specific cytotoxicity of a human immunoglobulin directed Fab'-ricin A chain conjugate. *J. Immunol.* 125:2610-2616.
301. Steplewski, Z., Lubeck, M.D. and Koprowski, H. (1983) Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies of tumors destroy human cancer cells. *Science* 221:865-867.
302. Chatenoud, L. (1986) The immune response against therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol. Today* 7:367-368.
303. Dillman, R.O. (1990) Human antimouse and antiglobulin responses to monoclonal antibodies. *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 3:1-15.
304. Byers, V.S. and Baldwin, R.W. (1988) Therapeutic strategies with monoclonal antibodies and immunoconjugates. *Immunology* 55:329-335.

305. Khazaeli, M., LoBuglio, A.F., Wheler, R., Haynes, A., Mischak, R. and Spitler, L.E. (1988) The effects of immunosuppressive regimens on human immune response to murine monoclonal anti-melanoma antibody-ricin A chain. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29:418-425.
306. Riechmann, L., Calrk, M., Waldmann, H. and Winter, G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332:323-327.
307. Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T. and Winter, G. (1989) Cloning immunoglobulin variable domains for expression by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837.
308. Ward, E.S., Güssow, D.H., Griffiths, A.D., Jones, P.T. and Winter, G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341:544-546.
309. Davis, G.T., Bedzyk, W.D., Voss, E.W. and Jacobs, T.W. (1991) Single chain antibody (SCA) encoding gene: one-step construction and expression in eukaryotic cells. *Bio/Technology* 9:165-169.
310. Winter, G. and Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature* 349:293-299.
311. Gherardi, E. and Milstein, C. (1992) Original and artificial antibodies. *Nature* 357:201-202.
312. Bartek, J., Taylor-Papadimitriou, J., Miller, W. and Millis, R. (1988) Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human breast tissues and tumours. *Int. J. Cancer* 36:299-306.
313. Horan Hand, P., Nuti, M., Cokler, D. and Schlom, J. (1983) Definition of antigenic heterogeneity and modulation among human mammary carcinoma cell populations using monoclonal antibodies to tumor associated antigens. *Cancer Res.* 43:728-735.
314. Cattoretti, T., Rilke, F., Andreola, S., D'Amato, L. and Delia, D. (1988) p53 expression in breast cancer. *Int. J. Cancer* 41:178-183.
315. Horan Hand, P., Thor, A. and Wunderlich, D. (1984) Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5227-5231.
316. Basu, A., Murthy, U., Rodeck, U., Herlyn, M., Mattes, L. and Das, M. (1987) Presence of tumor-associated antigens in epidermal growth factor receptors from different human carcinomas. *Cancer Res.* 47:2531-2536.
317. Bremer, E.G., Levery, S.B., Sonnino, S., Ghidoni, R., Canevari, S., Kannagi, R. and Hakomori, S-i. (1984) Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MB1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J. Biol. Chem.* 259:14773-14777.
318. Reitsfeld, R.A. and Cheresch, D.A. (1987) Human tumor antigens. *Adv. Immunol.* 40:323-377.
319. Gatter, K.C., Alcock, C., Heryet, A. and Mason, D.Y. (1985) Clinical importance of analysing malignant tumours of uncertain origin with immunohistological techniques. *Lancet* i:1302-1305.
320. Gatter, K.C. and Mason, D.Y. (1982) The use of monoclonal antibodies for histopathologic diagnosis of human malignancy. *Semin. Oncol.* 9:517-525.

321. Szpak, C.A., Johnston, W.W. and Roggli, V. (1986) The diagnostic distinction between malignant mesothelioma of the pleura and adenocarcinoma of the lung as defined by a monoclonal antibody (B72.3). *Am. J. Pathol.* 5:107-115. 296.
322. Milstein, C. and Cuello, A.C. (1984) Hybrid hybridomas and the production of bi-specific monoclonal antibodies. *Immunol. Today* 5:299-304.
323. Canevari, S., Ménard, S., Mezzanzanica, D., Miotti, S., Pupa, S.M., Lanzavecchia, A. and Colnaghi, M.I. (1988) Anti-ovarian Carcinoma anti-T3 heteroconjugates or hybrid antibodies induce tumor cell lysis by cytotoxic T-cells. *Int. J. Cancer* 2:18-21.
324. Pastan, I., Willingham, M.C. and FitzGerald, J.P. (1986) Immunotoxins. *Cell* 47:641-648.
325. Cumber, A.J., Forrester, J.A., Foxwell, B.M.J., Ross, W.C.J. and Thorpe, P.E. (1985) Preparation of antibody-toxin conjugates. *Methods Enzymol.* 112:207-225.
326. Carlsson, J., Drevin, H. and Axén R. (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* 173:723-737.
327. Murphy, J., Bishai, W., Borowski, M., Miyahara, A., Boyd, J. and Nagle, S. (1986) Genetic construction, expression, and melanoma-selective cytotoxicity of a diphtheria toxin-related α -melanocyte-stimulating hormone fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262.
328. Chaudhary, V.K., FitzGerald, D.J., Adhya, S. and Pastan, I. (1987) Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor types α and *Pseudomonas* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4538-4552.
329. King, T.P. and Kochoumian, L. (1978) Preparation of protein conjugates via intermolecular disulphide bond formation. *Biochemistry* 17:1499-1506.
330. Blakey, D.C., Watson, G.J., Knowles, P.P. and Thorpe, P.E. (1987) Effect of chemical deglycosylation of Ricin A chain on the *in vivo* fate and cytotoxic activity of an immunotoxin composed of ricin A chain and anti-Thy 1.1 antibody. *Cancer Res.* 47:947-952.
331. Worrell, N.R., Cumber, A.J., Parnell, G.D., Mirza, A., Forrester, J.A. and Ross, W.C.J. (1986) Effect of linkage variation on pharmacokinetics of ricin A chain-antibody conjugates in normal rats. *Anticancer Drug Desig.* 1:179-188.
332. Canevari, S., Orlandi, R., Ripamonti, M., Tagliabue, E., Agnanno, S., Miotti, S., Menard, S. and Colnaghi, M.I. (1985) Ricin A chain conjugated with monoclonal antibodies selectively killing human carcinoma cells *in vitro*. *J. Natl. Can. Inst.* 75:831-839.
333. Dosio, F., Cogliati, T., Canevari, S., Mezzanzanica, D., Brusa, P., Del Prino, L., Colnaghi, M.I. and Cattell, L. (1989) Antibody-toxin conjugate preparation: effects of the linker on activity and stability. *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals.* 2:101-115.
334. Kitagawa, T. and Aikawa, T. (1976) The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed nasal fever. *J. Biochem.* 76:232-236.

335. Thorpe, P.E., Brown, A.N.F., Bremner, J.A.G., Jr., Foxwell, B.M.J. and Stirpe, F. (1985) An immunotoxin composed of monoclonal anti-Thy 1.1. antibody and a Ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis*: potent antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. J. Natl. Can. Inst. 75:151-159.
336. Thorpe, P.E., Wallace, P.M., Knowles, P.P., Relf, M.G., Brown, A.N.F., Watson, G.J., Knyba, R.E., Wawrynczak, E.J. and Blakey, D.C. (1987) New coupling agents for the synthesis of immunotoxins containing a hindered disulfide bond with improved stability *in vivo*. Cancer Res. 47:5924-5931.
337. FitzGerald, D., Idziorek, T., Batra, J.K., Willingham, M. and Pastan, I. (1990) Antitumor activity of a thioether-linked immunotoxin: OVB3-PE. Bioconjug. Chem. 1:264-268.
338. Duncan, R.J.S., Weston, P.D. and Wrigglesworth, R. (1983) New coupling agents for the synthesis of immunoconjugates. Anal. Biochem. 132:68-73.
339. Higgins, W. and Miles, E.W. (1978) Design of a new thioether-linked agent for the protein conjugation. J. Biol. Chem. 253:4648-4652.
340. Bjorn, M.J., Ring, D. and Frankel, A. (1985) Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins. Cancer Res. 45:1214-1221.
341. Mashuo, Y., Kishida, K., Saito, M., Umemoto, N. and Hara, T. (1982) Importance of the antigen-binding valency and the nature of the cross-linking bond in ricin A-chain conjugates with antibody. J. Biochem. 91:1583-1591.
342. Bjorn, M.J., Groetsema, G. and Scalpino, L. (1986) Antibody-*Pseudomonas* exotoxin A conjugates cytotoxic to human breast cancer cells *in vitro*. Cancer Res. 46:3262-3267.
343. Anderson, M.E. and Meister, A. (1980) Dynamic state of glutathione in blood plasma. J. Biol. Chem. 255:9530-9533.
344. Moolten, F.L., Capparelli, N.J. and Cooperband, S.R. (1972) Antitumor effects of antibody-diphtheria toxin conjugates: use of hapten-coated tumor cells as an antigenic target. J. Natl. Cancer Inst. 49:1057-1062.
345. Chang, T.M. and Neville, D.M., Jr. (1977) Receptor-mediated transport of the hybrid protein ricin-diphtheria toxin fragment A with subsequent ADP-ribosylation of intracellular Elongation Factor II. J. Biol. Chem. 252:1505-1510.
346. Gilliland, D.G., Collier, R.J., Moehring, J.M. and Moehring, T.J. (1978) Antibody-directed cytotoxic agents: Use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chains to colorectal carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5319-5323.
347. Cuatrecasas, P. and Anfinsen, C.B. (1971) Affinity chromatography. Annu. Rev. Biochem. 40:259-275.
348. Royston, I., Majda, J.A., Baird, S.M., Meserve, B.L. and Griffiths, J.C. (1980) Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65,000-dalton antigen of T-cells (T 65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. J. Immunol. 125:2610-2615.
349. Brown, J.P., Wright, P.W., Hart, C.E., Woodbury, R.G., Hellström, K.E. and Hellström, I. (1980) Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immunoprecipitation with monoclonal antibodies. J. Biol. Chem. 255:4980-4984.

350. Brinkmann, U., Pai, L.H., FitzGerald, D.J., Willingham, M. and Pastan, I. (1991) B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8616-8620.
351. Chaudhary, V.K., Batra, J.K., Gallo, M.G., Willingham, M.C., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1990) A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* a a single-chain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1066-1070
352. Pastan, I. and FitzGerald, D. (1991) Recombinant toxins for cancer treatment. *Science* 254:1173-1177.
353. Weiner, L.M., O'Dwyer, J., Kitson, J., Comis, R.L., Frankel, A.E., Bauer, R.J., Konrad, M.S. and Groves, E.S. (1989) Phase I evaluation of an anti-breast carcinoma monoclonal antibody '260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate. *Cancer Res.* 49:4062-4067.
354. Knowles, P.P. and Thorpe, P.E. (1987) Purification of immunotoxins containing ricin A-chain and abrin A-chain using Blue Sepharose CL-6B. *Anal. Biochem.* 160:440-443.
355. Bumol, T.F., Wang, Q.C., Reisfeld, R.A. and Kaplan, N. (1983) Monoclonal antibody and an antibody-toxin conjugate to a cell surface proteoglycan of melanoma cells suppress *in vivo* tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:529-533.
356. Bernard, M.I., Foon, K.A., Oeltmann, T.N., Key, M.E., Hwang, K.M., Clarke, G.C., Christensen, W.L., Hoyer, L.C., Hanna, M.G., Jr. and Oldham, R.K. (1983) Guinea pig line 10 hepatocarcinoma model: characterization of monoclonal antibody and *in vivo* effect of unconjugated antibody and conjugated to diphtheria toxin A chain. *Cancer Res.* 43:4420-4428.
357. Uckun, F.M., Jaszcz, W., Ambrus, J.L., Fauci, A.S., Gajl-Peczalska, K., Song, C.W., Wick, M.R., Myers, D.E., Waddick, K. and Ledbetter, J.A. (1988) Detailed studies on expression and function of CD 19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood*, 71:13-29.
358. Myers, D.E., Irvin, J.D., Smith, R.S., Kuebelbeck, V.M. and Uckun, F.M. (1991) Production of a pokeweed antiviral protein (PAP)-containing immunotoxin, B43-PAP, directed against the CD19 human B lineage lymphoid differentiation. *J. Immunol. Methods* 136:221-237.
359. Cumber, A.J., Henry, R.V., Parnell, G.D. and Wawrzyniczak, E.J. (1990) Purification of immunotoxins containing the ribosomes-inactivating proteins gelonin and momordin using high performance liquid immunoaffinity chromatography compared with Blue Sepharose CL-6B affinity chromatography. *J. Immunol. Methods* 135:15-24.
360. Harris, P., Reed, E., King, D.W. and Suciu-Foca, N. (1991) *In vitro* studies of the effect of MAb NDA 4 linked to toxin on the proliferation of a human EBV-transformed lymphoblastoid B cell line and of gibbon MLA leukemia cell line. *Cell. Immunol.* 134:85-95.
361. Rosenblum, M.G., Murray, J.L., Cheung, L., Rifkin, R., Salmon, S. and Bartholomew, R. (1991) A specific and potent immunotoxin composed of antibody ZME-018 and the plant toxin gelonin. *Mol. Biotech.* 3:6-13.

362. Stirpe, E., Wawrzynczak, E.J., Brown, A.N.F., Knyba, R.E., Watson, G.J., Barbieri, L. and Thorpe, P.E. (1988) Selective cytotoxic activity of immunotoxins composed of a monoclonal anti-Thy 1.1. antibody and the ribosome-inactivating proteins bryodin and momordin. *Br. J. Cancer* 58:558-561.
363. Ebert, R.F. and Spryn, L.A. (1990) Immunotoxin construction with a ribosome-inactivating protein from barley. *Bioconjug. Chem.* 1: 331-336.
364. Wang, Q.C., Ying, W.B., Xie, H., Zhang, Z.C., Yang, Z.H. and Lin, L.Q. (1991) A trichosanthin-monooclonal antibody conjugate specifically cytotoxic to human hepatoma cells *in vitro*. *Cancer Res.* 51:3353-3355.
365. Ramakrishnan, S., Enghlid, J.J., Bryant, H.L., Jr. and Xu, F.J. (1989) Characterization of a translation inhibitory protein from *Luffa aegyptiaca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:509-516.
366. Wiedlocha, A., Sandvig, K., Walzel, H., Radzikowsky, C. and Olsnes, S. (1991) Internalization and action of an immunotoxin containing mistletoe lectin A-chain. *Cancer Res.* 51:916-920.
367. Filipovich, A.H., Vallera, D.A., Youle, R.J., Neville, D.M., Jr. and Kersey, J.H. (1985) *Ex vivo* T cell depletion with immunotoxins in allogeneic bone marrow transplantation: the pilot clinic study for prevention of graft-versus host disease. *Transplantation Proc.* 17: 442-444.
368. Wawrzynczak, E.J., Watson, G.J., Cumber, A.J., Henry, R.V., Parnell, G.D., Rieber, E.P. and Thorpe, P.E. (1991) Blocked and non-blocked ricin immunotoxins against the CD4 antigen exhibit higher cytotoxic potency than a ricin A chain immunotoxin potentiated with ricin B chain or with B chain immunotoxin. *Cancer Immunol. Immunother.* 32:289-295.
369. Ramakrishnan, S. and Houston, L.L. (1984) Prevention of growth of leukemia cells in mice by monoclonal antibodies directed against Thy 1.1. antigen disulfide linked to two ribosomal inhibitors: Pokeweed antiviral protein or ricin A chain. *Cancer Res.* 44:1398-1404.
370. Sung, C., Wilson, D. and Youle, R.J. (1991) Comparison of protein synthesis inhibition kinetics and cell killing induced by immunotoxins. *J. Biol Chem.* 266:14159-14162.
371. Jansen, F.K., Blythman, H.E., Bourrie, B., Carriere, D., Casellas, P., Dussossoy, D., Gros, O., Laurent, J.C., Liance, M.C., Poncelet, P., Richer, G. and Vidal, H. (1985), in 'Receptor-mediated targeting of drugs' G. Gregoriadis, G. Poste, J. Senior, and A. Trouet Eds., Plenum Press, New York, USA, p. 147.
372. Worrel, N.R., Cumber, A.J., Parnell, G.D., Ross, W.C.J and Forrester, J.A. (1986) Fate of an antibody-toxin A chain conjugate administered to normal rats. *Biochem. Pharmacol.* 35:417-425.
373. Blackey, D.C. and Thorpe, P.E. (1988) An overview of therapy with immunotoxins containing ricin or its A chain. *Antibody Immunocjug. Immunopharmacol.* 1:1-15.
374. Vitetta, E.S., Fulton, R.J. and Uhr, J.W. (1984) Cytotoxicity of a cell-reactive immunotoxin containing ricin A chain is potentiated by an anti-immunotoxin containing ricin B chain. *J. Exp. Med.* 160:447-452.

375. Lambert, J.M., Senter, P.D., Yau-Young, A., Blattler, W.A. and Goldmacher, V.S. (1985) Purified immunotoxins that are reactive with human lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 260:12035-12039.
376. Cumber, A.J. and Parnell, G.D. (1986) HPLC affinity purification of an antibody A chain conjugate. *Chromatogram* 7:9-15.
377. Antoni, G., Bigio, M., Borri, G., Casaggli, M.C. and Neri, P. (1983) Purification of diphtheria toxin by chromatography on Cibacron Blue-Sepharose. *Experientia* 39:885-886.
378. Sperti, S., Montanaro, L., Rambelli, F. and Zamboni, M. C. (1986) Interaction of alpha-sarcin and gelonin with Cibacron Blue. *Biochem. Reports.* 6:901-908.
379. Forrester, J.A., McIntosh, D.P., Cumber, A.J., Parnell, G.D. and Ros, W.C.J. (1984) Delivery of ricin and abrin A chains to human carcinoma cells following covalent linkage to monoclonal antibody LICR-LIND-Fib75. *Cancer Drug Delivery* 1:283-292.
380. Casellas, P., Bourrie, B.J., Gros, P. and Jansen, F.K. (1984) Kinetics of cytotoxicity induced by immunotoxins. Enhancement by lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *J. Biol. Chem.* 259:9359-9364.
381. Ghetie, M.A., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1991) Covalent binding of human α_2 -macroglobulin to deglycosylated ricin A chain and its immunotoxins. *Cancer Res.* 51:1482-1487.
382. Peterson, J.A., Buehring, G.C., Taylor-Papadimitriou, J. and Ceriani, R.L. (1978) Expression of human mammary epithelial (HME) antigens in primary cultures of normal and abnormal breast tissue. *Int. J. Cancer* 22:655-661.
383. Schlom, J. (1986) Basic principles and applications of monoclonal antibodies in the management of carcinomas. *Cancer Res.* 46:3225-3228.
384. Press, O., Vitetta, E., Farr, A.G., Hansen, J.A. and Martin, D.J. (1986) Evaluation of ricin A-chain immunotoxins directed against human T cells. *Cell. Immunol.* 102:10-20.
385. Oeltmann, T.N. and Frankel, A.E. (1991) Advances in immunotoxins. *FASEB J.* 5:2334-2337.
386. Douay, L., Gorin, N.C., Lopez, M., Casellas, P., Liance, M.C., Jansen, F.K., Viosin, G.A., Baillou, C., Laporte, J.P., Najman, A. and Duhamel, G. (1985) Evidence for absence of toxicity of T101 immunotoxins on human hematopoietic progenitor cells prior to bone marrow transplantation. *Cancer Res.* 45:438-441.
387. Colombatti, M., Greenfield, L. and Youle, R.J. (1986) Cloned fragment of diphtheria toxin linked to I-cell specific antibody identifies regions of B chain active in cell entry. *J. Biol. Chem.* 261:3030-3035.
388. Jaffr  zou, J-P., Levade, T., Thurneyssen, O., Chiron, M., Bordier, C., Attal, M., Chatelain, P. and Laurent, G. (1992) *In vitro* and *in vivo* enhancement of ricin-A chain immunotoxin activity by novel indolizine calcium channel blockers: delayed intracellular degradation linked to lipidosis induction. *Cancer Res.* 52:1352-1359.
389. Colombatti, M., Dell'Arciprete, L., Chignola, R. and Tridente, G. (1990) Carrier protein-momensin conjugates: enhancement of immunotoxin cytotoxicity and potential in tumor treatment. *Cancer Res.* 50:1385-1391.

390. Candiani, C., Franceschi, A., Chignola, R., Pasti, M., Anselmi, C., Benoni, G., Tridente, G. and Colombatti, M. (1992) Blocking effect of human serum but not of cerebrospinal fluid on ricin A chain immunotoxin potentiation by monensin or carrier protein-monensin. *Cancer Res.* 52:623-630.
391. Vitetta, E.J., Cushley, W. and Uhr, J. (1983) Synergy of ricin A chain-containing immunotoxins and ricin B chain-containing immunotoxins in *in vitro* killing of neoplastic human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6332-6338.
392. Bourrie, B.J.P., Casellas, P., Blythman, H.E. and Jansen, F.K. (1986) Study of the plasma clearance of antibody-ricin-A-chain immunotoxins. Evidence for specific recognition sites on the A chain that mediate rapid clearance of the immunotoxin. *Eur. J. Biochem.* 155:1-10.
393. Thorpe, P.E., Detre, S.I., Foxwell, B.M.J., Brown, A.N.F., Skilleter, D.N., Wilson, G., Forrester, J.A. and Stirpe, F. (1985) Modification of the carbohydrate in ricin with metaperiodate-cyanoborohydride mixtures. Effects on binding, uptake and toxicity to parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver. *Eur. J. Biochem.* 147:197-206.
394. Wawrzynczak, E.J., Cumber, A.J., Henry, R.V., May, J., Newell, D.R., Parnell, G.D., Worrell, N.R. and Forrester, J.A. (1990) Pharmacokinetics in the rat of a panel of immunotoxins made with abrin A chain, ricin A chain, gelonin and momordin. *Cancer Res.* 50:7519-7526.
395. Ravel, S., Colombatti, M. and Casellas, P. (1992) Internalization and intracellular fate of anti-CD5 monoclonal antibody and anti-CD5 ricin A-chain immunotoxin in human leukemic T cells. *Blood* 79:1511-1517.
396. Jansen, B., Valleria, D.A., Jaszcz, W.B., Nguyen, D. and Kersey, J.H. (1992) Successful treatment of human acute T-cell leukemia in SCID mice using the anti-CD7-deglycosylated ricin A-chain immunotoxin DA7. *Cancer Res.* 52:1314-1321.
397. Stong, R.C., Uckun, F.M., Youle, R.J., Kersay, J.H. and Valleria, D.A. (1985) Use of multiple T cell-directed intact ricin immunotoxins for autologous bone marrow transplantation. *Blood* 66:627-635.
398. Uckun, F.M., Stong, R.C., Youle, R.J. and Valleria, D.A. (1985) Combined *ex vivo* treatment with immunotoxins and mafosfamid, a novel immunochemotherapeutic approach for elimination of neoplastic T cells from autologous marrow grafts. *J. Immunol.* 134:3504-3515.
399. Uckun, F.M., Gajl-Peczalska, K., Meyers, D.E., Ramsay, N.C., Kersey, J.H., Colvin, M. and Valleria, D.A. (1987) Marrow purging in autologous bone marrow transplantation for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: efficacy of *ex vivo* treatment with immunotoxins and 4-hydroperoxycyclophosphamide against fresh leukemic marrow progenitor cells. *Blood* 69:361-366.
400. Casellas, P., Canat, X., Fauser, A.A., Gros, O., Laurent, G., Poncelet, P. and Jansen, F.K. (1985) Optimal elimination of leukemic T cells from human bone marrow with T101-Ricin A-Chain immunotoxin. *Blood* 65:289-297.
401. Martin, P.J., Hansen, J.A., Torok-Storb, B., Moretti, L., Press, O., Storb, R., Thomas, E.D., Weiden, P.L. and Vitetta, E.J. (1988) Effects of treating marrow with a CD7-specific immunotoxin for prevention of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 3:437-444.

402. Antin, J.H., Bierer, B.E., Smith, B.R., Ferrara, J., Guinan, E.C., Sieff, C., Golan, D.E., Macklis, R.M., Tarbell, N.J., Lynch, E., Reicher, T.A., Blythman, H., Bouloux, C., Rappeport, J.M., Burakof, S.J. and Weinstein, H.J. (1991) Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients antibodies with hematologic malignancies. *Blood* 78:2139-2149.
403. Hertler, A.A., Schlossman, D.M. and Borowitz, M.J. (1988) A phase I study of T 101-ricin A chain immunotoxin in refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Biol. Response Modif.* 7:97-113.
404. Spitler, L.E., Del Rio, M., Khentigan, A., Wedel, N.I., Brophy, N.A., Miller, L.L., Harkonen, W.S., Rosendorf, L.L., Lee, H.M., Mischak, R.P., Kawahata, R.T., Stoudemire, J.B., Fradkin, L.E., Bautista, E.E. and Scannon, P.J. (1987) Therapy of patients with malignant melanoma using a monoclonal antimelanoma antibody-ricin A chain immunotoxin. *Cancer Res.* 47:1717-1723.
405. Oratz, R., Speyer, J.L., Wernz, J.C., Hochster, H., Myers, M., Mischak, R. and Spitler, L.E. (1990) Anti-melanoma monoclonal antibody A chain immunoconjugate (XMMME-001-RIA) plus cyclophosphamide in the treatment of metastatic malignant melanoma: results of a Phase II trial. *J. Biol. Response. Modif.* 9:345:354.
406. Byers, V.S., Rodvien, R., Grant, K., Durrant, L.G., Hudson, K.H., Badwin, R.W. and Scannon, P.J. (1989) Phase I study of monoclonal antibody ricin A chain immunotoxin XOMAZYME-791 in patients with metastatic colon cancer. *Cancer Res.* 49:6153-6160.
407. Fulton, R.J., Tucker, T.F., Vitetta, E.S. and Uhr, J.W. (1988) Pharmacokinetics of tumor-reactive immunotoxins in tumor-bearing mice: effect of antibody valency and deglycosylation of the ricin A chain on clearance and tumor localization. *Cancer Res.* 48:2618-2625.
408. Hynes, N.E., Harwerth, I.M., and Wels, W. (1991) The c-erb-2 protein as a target for directing cytotoxic agents to tumor cells. *Eur. J. Cancer.* 27(suppl. 3)S9.
409. Vitetta, E.S. (1990) Immunotoxins: new therapeutic reagents for autoimmunity, cancer and AIDS. *J. Clin. Immunol.* 10 (suppl. 6) 15S-18S.
410. Vallera, D.A., Carroll, S.F., Brier, S. and Blazar, B.R. (1992) Anti-CD3 immunotoxin prevents low-dose Si2, interferon-induced autoimmune diabetes in mouse. *Diabetes* 41:457-464.
411. Pacheco-Silva, A., Bastos, M.G., Muggia, R.A., Pankewycz, O., Nichols, J., Murphy, J.R., Strom, T.B. and Rubin-Kelley, V.E. (1992) Interleukin 2 receptor targeted blocks diabetogenic autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* 22:697-702.
412. Ghetie, V., Slaughter, C., Wheelr, H.T., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1991) CD4 peptide-protein conjugates, but not recombinant human CD4, bind to recombinant gp120 from immunodeficiency virus in the presence of serum from AIDS patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5690-5693.
413. Olsen, S., Petersen, K., Christensen, T.B. and Pihl, A. (1992) Studies on the structure and properties of the human CD4 protein. *Advances in Immunology and Biochemistry*, Vol. 45, Academic Press, Acta 155:1-10.

414. Miotti, S., Aguanho, S., Canevari, S., Piotti, A., Orlandi, R., Sonnino, S. and Colnaghi, M.I. (1985) Biochemical analysis of human ovarian cancer-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 45:826-832.
415. Canevari, S., Fossati, G., Balsari, A., Sonnino, S. and Colnaghi, M.I. (1983) Immunochemical analysis of the determinant recognized by a monoclonal antibody (MBr1) which specifically binds to human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 43:1301-1305.
416. Tosi, E., Canevari, S., Alberti, P., Gadina, M., Muñoz, S.M., Salvarelli, S.M. and Colnaghi, M.I. (1991) The anti EGFr MAb MINT5 is able to specifically target the RIP α-sarcin cytotoxicity against relevant target cells. *Eur. J. Cancer* 27:(suppl. 3)S57.
417. Harris, A.L. (1990) The epidermal growth factor receptor as a target for therapy. *Cancer Cells* 2:321-323.
418. Sancho Valls, J., Baldris Nacente, R. y Sanchez Coll (1989) en "Manual de medios de cultivo para microbiología", Adsa=Micro Ed. Barcelona, España pp. 159,219.
419. Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982) en "Immunochemistry in practice", Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Gran Bretaña. pp. 1-29.
420. Thorpe, P.E. and Ross, W.C.J. (1982) The preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin conjugates. *Immunol. Rev.* 62:119-158.
421. Vidal Caballero, M.A. (1984) en "Interacción de la IgM humana con la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Bases estructurales de la reactividad alternativa de inmunoglobulinas con proteína A". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
422. Mancini, G., Carbonara, O. and Heremans, S.J.F. (1965) A single-radial diffusion method for the immunological quantification of proteins. *Immunochemistry* 2:235-254.
423. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
424. Kachmar, J.F., Grant, G.H. and Path, F.R.C. (1976) en "Fundamentals of Clinical Chemistry" N.W. Tietz Ed. Nueva York, USA. pp. 264-376.
425. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (1955) The effect of complement in rabbit serum on the quantitative precipitin reaction. *Methods Enzymol.* 1:67-90.
426. Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
427. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
428. Studier, F.W. (1973) Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79:237-248.
429. Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of macromolecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412.
430. Wallevik, K. and Jensenius, J.C. (1982) Analysis and conservation of dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 8:1-21.

431. Funatsu, G., Mise, I., Matsuda, H. and Funatsu, M. (1978) Isolation and characterization of two constituent polypeptide chains of ricin. *E. Agric. Biol. Chem.* 42:851-859.
432. Dean, P.D.G and Watson, D.H. (1979) Protein purification using immobilised triazine dyes. *J. Chromatography* 165:301-319.
433. Herman, C.A. and Roberts, R. (1980) *Anal. Biochem.* 106:244-434.
434. Dicou, E. and Brachet, P. (1981) Interaction of the inhibitor of the 3'-5' cyclic AMP phosphodiesterase of *Dyctyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102:1172-1179.
435. Arnauz, P. and Gianazza, E. (1982) Purification of several plasmatic protein using immobilised triazine dyes. *FEBS Lett.* 137:167.
436. "CNBr-activated Sepharose 4B for immobilization of biopolymers" Pharmacia Fine Chemicals (1977). Pharmacia Ed. Uppsala, Suecia.
437. Cooper, M.D. and Butler, J.L. (1989) en "Fundamental Immunology", Paul, W.E. Ed., Raven Press., New York. pp. 1033-1058.
438. Campbell, A.M. (1984) en "Monoclonal antibody technology", R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg Editors. Elsevier Science Publishers. B.V., Amsterdam, Holanda pp. 456-478.
439. Goding, J.W. (1978) Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20:241-253.
440. Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (1961) en "Experimental Immunochimistry", ed. Charles C. Thomas Publisher, Illinois, Michigan, USA, pp. 22-96.
441. Ouchterlony, Ö. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis en "Progress in Allergy", Vol. V, Kallos, P. ed., Karger, Basilea, Suiza. pp. 1-78.
442. Chess, L., MacDermott, R.P. and Schlossman, S.F. (1974) Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. I. Quantitive isolation of human T and B cells and response to mitogens. *J. Immunol.* 113:1113-1118.
443. Fraker, P.J. and Speck, J.C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro 3a, 6a diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:849-857.
444. Greenwood, F.C., Hunter, W. M. and Glover, J.S. (1963) The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89:141-143.
445. Hubbard, A.L. and Cohn, Z.A. (1976) en "Biochemical Analysis of Membranes" Ed. A.H. Maddy. Chapman and Hall, Londres, Inglaterra. pp. 427-501.
446. Lovelock, J.E. and Bishop, M.W. (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394-1395.
447. Krawetz, S.A., Narayanan, A.S. and Anwar, R.A. (1983) Protein-inhibition in cell-free systems. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61:274-285.
448. Kumagai, H., Igarashi, K., Takayama, I., Watanabe, F., Sugimoto, E. and Hirose, S. (1980) A microsomal endoribonuclease from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 698:324-331.
449. Lison, L. (1961) L'analisi dei probiti. La dose efficace ed il limite di dose totale. *medicina (Torino)* 10 (1) Statistica applicata alla biologia sperimentale, ed. Garattini, S. pp. 245-254. pp. 245-254.

450. Bochner, B., Carruthers, G., Kampmann, J. and Steiner, J. (1983) Definition of terms (capitulo 11) en "Handbook of Clinical Pharmacology". Little, Brown and Company Ed. Boston, USA, pp. 75-93.
451. Brooks, D.E., Means, A.R., Wright, E.J., Singh, S.P. and Tiver, K.K. (1986) Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. Eur. J. Biochem. 165:13-18.
452. Muñoz, S.M., Salvarelli, S.M., Saiz, M.I. and Conde, F.P. (1992) A toxic protein from *Bryonia dioica* Jacq. fruits: the brydiofin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:1011-1018.
453. Furutani, M., Kashiwagi, K., Ito, K., Endo, Y. and Igarashi, K. (1992) Comparison of the modes of action of a Vero toxin (a Shiga-like toxin) from *Escherichia coli*, of ricin, and of α -sarcin. Arch. Biochem. Biophys. 293:140-146.
454. Scopes, R.K. (1986) Strategies for enzyme isolation using dye-ligand and related adsorbents. J. Chromatography 376:131-140.
455. Liu, Y-Ch. and Stellwagen, E. (1987) Accessibility and multivalency of immobilized Cibacron Blue F3GA. J. Biol. Chem. 262:583-588.
456. Salvarelli, S.M., Panadero, M.I., Conde, F.P., Gadina, M., Tosi, E., Ferreri, A.J.M., Canevari, S., Colnaghi, M.I. and Muñoz, S.M. Study of a contaminant of Aspergillins: influence on theirs immunogenicity. "IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress", Póvoa de Varzim, Portugal, Septiembre 29-Octubre 2, 1991, p. 4 P103.
457. Velasco-Martin, A. (1976) Farmacocinética y biotransformación en "Farmacología y su proyección a la clínica". 13ª edición, B. Lorenzo-Velázquez Ed. Editorial OTEO, Madrid, España. pp. 30-59. Falta editorial y ciudad y país.
458. Cogliati, T., Canevari, S., Caldera, M., Brusa, P., Dosio, F., Conde, F.P., Muñoz, S.M. and Colnaghi, M.I. Targeting of toxins to human ovarian carcinoma: Preparation and characterization of toxin-Mab immunoconjugates. NATO/EMBO/ FEBS International Summer School on Immunoconjugates. Grecia, Junio, 1989, p. 275.
459. Jagus, R. and Safer, B. (1981) Activity of eukaryotic initiation factor 2 is modified by processes distinct from phosphorylation. II. Activity of eukaryotic initiation factor 2 in lysate is modified by oxidation-reduction state of its sulphhydryl groups. J. Biol. Chem. 256:1324-1329.
460. Prentice, R.G., Janossy, G., Price-Jones, L., Trejdosiewicz, L.K., Panigrahi, D., Grapnakos, S., Ivory, K., Blacklock, H.A., Gilmore, M.J.M.L., Iodman, N., Skeggs, D.B.L., Ball, S., Patterson, J. and Horfbrand, A.V. (1984) Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. Lancet iii:472-475.
461. Gadina, M., Tosi, E., Caldera, M., Cassalini, P., Canevari, S., Muñoz, S., Conde, F.P. and Colnaghi, M.I. Derivatization and pharmacokinetics of an anti EGFR Mab, R1Ps and immunotoxin. 8th International Hammersmith Meeting. Advances in the Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology. Porto Carras, Halkidiki, Grecia. Mayo 1991, p. 40.
462. Vetter, R., López, J.M., Vallerón, D.A. and López, M. (1988) Anticancerous reagents for human bone marrow transplant. 12th International Conference on Anticancer Research. Madrid, 1988, pp. 108-110.

463. Godal, A., Fodstad, O. and Pihl, A. (1983) Antibody formation against the cytotoxic proteins abrin and ricin in humans and mice. *Int. J. Cancer* 32:515-521.
464. Mullbacher, A. and Eichner, R.D. (1984) Immunosuppression *in vitro* by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3835-3837.
465. Kimura, T., Matsueda, R., Nakagawa, Y. and Kaiser, T. (1982) A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Anal. Biochem.* 122:274-281.
466. Vitetta, E.S., Fulton, R.J., May, R.S., Tili, M. and Uhr, J.W. (1987) Immunotoxins: redirecting nature's poisons. *Science* 238:1098-1104.
467. Barton, L.L., Lineback, D.R. and Georgi, C.E. (1969) The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by *Aspergilli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 15:327-344.
468. Muñoz, S.M., Canevari, S., Caldera, M., Saiz, M.I., Salvarelli, S.M., Prieto, M.A., Tosi, E., Colnaghi, M.I. and Conde, F.P. (1991) Aspergillins: a family of ribonucleases en "Structure, mechanism and function of ribonucleases". Cuchillo, C.M., de Llorens, R., Nogués, M.V. and Parés, X. Eds., IBF Publications Universitat Autònoma de Barcelona, España, pp. 255-261.
469. Brosius, J., Dull, T.J. and Woller, H.F. (1980) Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:201-204.
470. Roe, B.A., Ma, D.P., Wilson, R.K. and Wong, J.F.H. (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* 260:9759-9774.
471. Olsnes, S. and Pihl, A. (1973) Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. *Eur. J. Biochem.* 35:179-185.
472. Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzini, E., Montanaro, L., Sperti, S., Bonetti, E. and Stirpe, F. (1978) Modeccin, the toxin of *Adenia digitata*. Purification, toxicity and inhibition of protein synthesis *in vitro*. *Biochem. J.* 174:491-496.
473. Olsnes, S., Stirpe, F., Sanvig, K. and Pihl, A. (1982) Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *viscum album* L. (mistletoe). *J. Biol. Chem.* 257:441-496.
474. Barbieri, L., Bolognesi, A., Genini, P., Falasca, A.L., Minghetti, A., Garofano, L., Guicciardi, A., Lippi, D., Miller, S.P. and Stirpe, F. (1989) Ribosome-inactivating proteins from plant cells in culture. *Biochem. J.* 257:801-807.
475. Ferreras, J.M., Merini, M.J., Iglesias, R., Muñoz, R. and Girbes, T. (1989) Isolation of a ribosome-inactivating type I protein from seeds of *Cucumis melo*. *Biochem. Int.* 13:201-207.
476. Gasellas, P., Dussossy, D., Falasca, A.L., Barbieri, L., Guicciardi, A., Ferrara, P., Bolognesi, A., Genini, P. and Stirpe, F. (1988) Inhibokinin, a ribosome-inactivating protein from seeds of *Trichosanthes latifolia* Roxburgh. *Eur. J. Biochem.* 159:341-346.

477. Yehng, H.W. and Li, W.W. (1987) B-tricosanthin: a new abortifacient protein from the chinese drug, wangna, *Trichosanthes cucurmeriodes*. Int. J. Peptide Protein. Res. 29:289-292.
478. Fodstad, O., Kvalheim, G., Godal, A., Lotsberg, J., Aamdal, S., Host, H. and Pihl, A. (1984) Phase I study of the plant protein ricin. Cancer Res. 44:862-865.
479. Lamy, B., Moutaouakil, M., Latge, J.P. and Davies, J. (1991) Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections. Mol. Microbiol. 5:1811-1815.
480. Moser, M., Cramer, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, G., Gmahl, M., Blaser, K. and Suter, M. (1992) Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. J. Immunol. 149:454-460.
481. Cawley, D.B., Herschamn, H.R., Gilliland, D.G. and Collier, R.J. (1980) Epidermal growth factor-toxin A chain conjugates: EGF-ricin A is a potent toxin while EGF-diphtheria fragment A is nontoxic. Cell 22:563-570.
482. Woodward, L. (1985) en "Pianti velenosi", Priuli e Verlucca editori, Ivrea, Italia. pp. 43,97.
483. Samuelsson, G. (1966) Chromatography of viscotoxin and oxidized viscotoxin on phosphate cellulose. Acta Chem. Scand. 20:1546-1554.
484. Carrasco, L., Vázquez, D., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P. and García-Olmedo, F. (1981) Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. Eur. J. Biochem. 116:185-189.
485. García-Olmedo, F., Carbonero, P., Hernández-Lucas, C., Paz-Ares, J., Ponz, F., Vicente, O. and Sierra, J.M. (1983) Inhibition of eukaryotic cell-free protein synthesis by thionins from wheat endosperm. Biochim. Biophys. Acta 740:52-56.
486. Coleman, W.H. and Roberts, W.K. (1982) Inhibitors of animal cell-free protein synthesis from grains. Biochim. Biophys. Acta 636:232-244.
487. Barber, O., Linas, G.G., Gavilanes, J.G. and Méndez, E. (1988) Isolation and characterization of thirteen new salt-soluble proteins from barley by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Planta 176:221-229.
488. González-Limas, G. (1990) en "Aislamiento de proteínas del endospermo de trigo, cebada y arroz: implicaciones patológicas e inhibición de la traducción in vitro". Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.